

SÉRIE A, N° 2322

N° d'Ordre :

3194

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

MARIAN JUTISZ

1^{re} Thèse. - Séparations chromatographiques des acides aminés
et des peptides.

2^e Thèse. - PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 14 Novembre 1949, devant la Commission d'examen

MM. PRÉVOST *Président*

WURMSER

FROMAGEOT

} *Examineurs*

1950

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen M. A. CHATELET

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	PIVETEAU	T	Géologie.
A. DENJOY	T	Théorie des Fonctions	ROCARD	T	Physique.
L. LUTAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	H. CARTAN	T	Mathématiques générales.
E. DARMOIS ..	T	Enseignement de Physique	SCHAEFFER	T	Physiologie des fonctions.
Robert LEVY ..	T	Physiologie comparée.	LAFFITTE	T	Chimie (P. C. B.).
Henri VILLAT ..	T	Mécanique des fluides et applications.	FAVARD		Calcul des probabilités et Physique-Mathématique.
Ch. JACOB	T	Géologie	COULOMB	T	Physique du Globe.
P. PASCAL	T	Chimie générale	Mlle COUSIN	T	Biologie animale (P. C. B.)
Mme RAMART-LUCAS	T	Chimie organique	CHRETIEN		Chimie (P. C. B.).
FOCH	T	Mécanique physique et expérimentale.	P. DRACH		Zoologie.
PAUTHENIER ..	T	Electrotechnique générale.	KASTLER		Physique.
De BROGLIE ..	T	Théories physiques.	CHATELET	T	Arithmétique et théorie des nombres.
JOB	T	Chimie générale.	EPHRUSSI	T	Génétique.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.	WURMSER	T	Biologie physico-chimique.
COMBES	T	Physiologie végétale	BAUER	T	Chimie - Physique.
GARNIER	T	Géométrie supérieure.	RIVIERE		Géologie (P. C. B.)
PERES	T	Mécanique rationnelle.	GAUTHERET		Biologie Végétale (P. C. B.)
HACKSPILL	T	Chimie minérale.	LUCAS		Physique
LAUGIER	T	Physiologie générale.	A. THOMAS		Evolution des êtres organisés.
TOUSSAINT	T	Technique Aéronautique	ARNULF		Optique appliquée.
M. CURIE	T	Physique (P.C.B.)	NAX MORAND		Physique.
G. RIBAUD	T	Hautes températures.	SOLEILLET		Physique.
CHAZY	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.	FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.
CROZE	T	Physique théorique et physique céleste.	DANJON	T	Astronomie.
DUPONT	T	Théories chimiques.	FROMAGEOT ..		Chimie Biologique.
VALIRON	T	Calcul différentiel et Calcul intégral.	LAPORTE		Physique générale et Radio-activité.
BARRABE	T	Géologie structurale et géologie appliquée.	JANET		Mathématiques générales
VAVON	T	Analyse et mesures chimiques.	PETIT	T	Biologie maritime.
G. DARMOIS ...	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique	QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.
Jacques BOURCART		Géographie physique et Géologie dynamique.	GALLIEN		Biologie animale (P. C. B.)
AUBEL	T	Chimie biologique.	EICHORN		Biologie végétale (P. C. B.)
Mme JULIOT-CURIE	T	Physique générale et Radioactivité.	De CUGNAC		Biologie végétale (P. C. B.)
PLANTEFOL	T	Botanique.	LAVAL		Physique (P. C. B.)
CABANNES	T	Recherches physiques.	Mlle CAUCHOIS.		Chimie-Physique.
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés.	THELLIER		Physique du Globe.
PREVOST	T	Chimie organique	AUDUBERT		Electrochimie.
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	L'HERITIER		Génétique.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.	GRIVET	T	Radio Electricité
WYART	T	Minéralogie.	PONCIN		Mécanique des fluides
TEISSIER	T	Zoologie.	THIRY	T	Mécanique appliquée.
MANGENOT	T	Biologie végétale.	DUBREIL		Mathématiques générales
P. AUGER	T	Physique quantitative et relative.	QUELET		Chimie (P. C. B.).
MONNIER		Physiologie générale.	CAGNIARD		Géophysique appliquée.
			CHAMPETIER ..		Chimie appliquée.
			CUVILLIER		Géologie structurale et Géologie appliquée.
			JUNG		Pétrographie.
			TRILLAT		Physique (P. C. B.)
			WIEMANN		Chimie (P. C. B.).
			LICHNEROWICZ.		Mathématiques Générales.
			JACQUINOT		Physique (P. C. B.)
			VASSY		Physique de l'atmosphère
			DESTOUCHES ..		Théories Physiques.

Secrétaire CH. MONIER

FACULTÉ DES SCIENCES

Nom du Candidat : JUTISZ

Prénoms : Marian

Date de la soutenance : 14 Novembre 1949

Numéro d'ordre : Série A - 2322 - N° 3194

(Ces deux mentions seront complétées par le service du Secrétariat de la Faculté

JUTISZ (Marian)

Séparations chromatographiques des acides aminés et des peptides. — *Coutances* : Impr. P. Bellée, 1951. In-8°, 68 p.

Th. Sc. Nat. Paris, 1949, Ser. A. 2322. N° 3194

JUTISZ (Marian)

Séparations chromatographiques des acides aminés et des peptides. — *Coutances* : Impr. P. Bellée, 1951. In-8°, 68 p.

Th. Sc. Nat. Paris, 1949, Ser. A. 2322. N° 3194

JUTISZ (Marian)

Séparations chromatographiques des acides aminés et des peptides. — *Coutances* : Impr. P. Bellée, 1951. In-8°, 68 p.

Th. Sc. Nat. Paris, 1949, Ser. A. 2322. N° 3194

JUTISZ (Marian)

Séparations chromatographiques des acides aminés et des peptides. — *Coutances* : Impr. P. Bellée, 1951. In-8°, 68 p.

Th. Sc. Nat. Paris, 1949, Ser. A. 2322. N° 3194

JUTISZ (Marian)

Séparations chromatographiques des acides aminés et des peptides. — *Coutances* : Impr. P. Bellée, 1951. In-8°, 68 p.

Th. Sc. Nat. Paris, 1949, Ser. A. 2322. N° 3194

SÉRIE A, N° 2322

N° d'Ordre :

3194

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

MARIAN JUTISZ

1^{re} Thèse. - Séparations chromatographiques des acides aminés
et des peptides.

2^e Thèse. - PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 14 Novembre 1949, devant la Commission d'examen

MM. PRÉVOST *Président*

WURMSER }
FROMAGEOT } *Examineurs*



INTRODUCTION

L'intérêt actuel de toute étude de la structure d'une protéine consiste en premier lieu en la connaissance de sa composition quantitative en acides aminés. Il est donc nécessaire de disposer tout d'abord de méthodes simples permettant la détermination exacte de tous les acides aminés dans un hydrolysats protéique. Cette connaissance, quoique fondamentale, ne peut toutefois pas nous renseigner sur la disposition de ces acides aminés dans un édifice aussi compliqué qu'une molécule protéique. Pour pouvoir aborder ce dernier problème, il est nécessaire d'isoler à partir d'une protéine, non pas les acides aminés, produits de l'hydrolyse totale, mais les peptides. Ce n'est que l'étude de ces peptides, provenant de l'hydrolyse partielle, qui nous permettrait d'esquisser le modèle grossier de la molécule protéique.

Si, comme nous le verrons dans la première partie de ce travail, les méthodes permettant l'isolement et le dosage des acides aminés sont relativement nombreuses, presque rien n'a été fait dans ce domaine pour les peptides.

Les difficultés que l'on rencontre au cours de l'analyse d'une protéine ne proviennent pas tant de la complexité de ses constituants qui ont des structures chimiques relativement simples, que des analogies de propriétés chimiques et physiques chez plusieurs d'entre eux. Il n'est pas facile, en effet, d'effectuer convenablement la détermination d'un quelconque constituant de la molécule protéique quand on se trouve en présence d'un milieu contenant plusieurs acides aminés et peptides, et dont chacun peut gêner la détermination de l'autre. Il nous a donc paru nécessaire

de disposer d'une méthode simple et sûre, permettant tout d'abord la séparation en quelques groupes distincts de l'ensemble des acides aminés et des peptides, avant d'effectuer leur dosage respectif.

En appliquant nos méthodes de séparation chromatographique non seulement aux acides aminés, mais aussi aux peptides, nous pensons avoir apporté notre concours dans un domaine qui n'est exploré que depuis peu de temps.

Dans la première partie de ce travail, nous avons passé en revue tout d'abord les méthodes les plus importantes permettant l'isolement des acides aminés et des peptides. Ensuite, nous avons réuni la bibliographie et les généralités concernant la chromatographie des acides aminés et des peptides.

La seconde partie est consacrée à la mise au point d'une méthode de séparation chromatographique des acides aminés et des peptides.

Dans la troisième partie, nous avons cherché à appliquer les techniques mises au point à l'étude de l'hydrolysât total de l'insuline, cette application constituant une vérification indispensable de la validité de l'ensemble des méthodes en question.

PREMIÈRE PARTIE

I. - Ensemble des méthodes permettant l'isolement des acides aminés et des peptides.

La première méthode générale d'isolement des acides aminés dans un hydrolysât de protéines est due à Fischer (36). Elle consiste en la séparation des acides aminés par la distillation fractionnée sous vide de leurs esters. Cette méthode très peu quantitative, avait d'autre part l'inconvénient de fournir des acides aminés partiellement racémisés.

C'est en cherchant à éviter cet inconvénient que Dakin (27) a inventé sa méthode d'extraction par les solvants. Dans cette méthode qui a pour principe la distribution des acides aminés entre deux phases : alcool butylique saturé d'eau et eau saturée d'alcool butylique, un hydrolysât protéique est séparé en cinq groupes, suivant les fonctions chimiques caractéristiques portées par les acides aminés. Si cette méthode n'a pas pris une grande extension, elle a été tout au moins à la base des travaux de Martin et Synge sur l'extraction des acides aminés par procédés à « contre-courant » tout d'abord (69), de la chromatographie de partage ensuite (70) et surtout de la technique de Craig (25, 26).

L'électrodialyse permet de séparer un hydrolysât en cinq fractions suivant les charges électriques des acides aminés (2, 42, 60, 80). On peut de cette façon obtenir la fraction basique intacte et pratiquement débarrassée des acides aminés acides et neutres, mais malheureusement les acides

dicarboxyliques subissent une décomposition dans le compartiment anodique.

Les méthodes de précipitation des acides aminés par les réactifs spécifiques sont très nombreuses. Parmi les précipitants les plus connus des acides aminés citons : acide flavianique, acide picrique, acide picrolonique, sel de Reinecke, sels de métaux lourds (16), acide phosphotungstique (117, 118). Toutes ces méthodes, qui étaient pourtant pendant de nombreuses années, les seules permettant l'isolement des acides aminés à partir d'un hydrolysât protéique, ont l'inconvénient d'entraîner par adsorption d'autres constituants du milieu et de nécessiter des quantités assez importantes de protéines.

L'analyse des protéines et l'isolement des acides aminés ont pris surtout un grand développement à partir de 1939-1940. On a vu naître des méthodes importantes, de principes tout à fait nouveaux.

Les dosages microbiologiques (voir pour les références 95) ont marqué certainement un grand pas dans la résolution du problème, mais ils nécessitent une préparation et un matériel spéciaux pour ce genre de travail.

Les méthodes par solubilité des précipités (9), par dilution d'isotopes (« isotope dilution ») (84), par mélanges azéotropiques des solvants (47), n'ont pas eu d'applications importantes. Par contre, la chromatographie a trouvé un champ très vaste d'applications dans ce domaine, et a donné lieu à de nombreux travaux.

II. - Bibliographie et généralités concernant la chromatographie d'acides aminés et de peptides.

Quand on considère la chromatographie de composés hydrosolubles, le mode d'adsorption fait intervenir la classification suivante : 1° - Chromatographie par adsorption vraie. 2° - Chromatographie par échange d'ions. 3° - Chromatographie par partage entre deux solvants. Ce mode de classification, employé tout d'abord par Wieland (125), a été conservé depuis par de nombreux auteurs (63, 71, 108).

1° - Chromatographie par adsorption vraie.

C'est le mode d'adsorption le plus anciennement connu, le même d'ailleurs dont s'est servi Tswett pour effectuer

ses premières séparations chromatographiques. L'adsorption vraie est un phénomène de surface particulier pour chaque adsorbant.

Charbon : Pour expliquer de façon complète le pouvoir adsorbant du charbon, il faudrait passer en revue une littérature très abondante sur ce sujet. Retenons seulement ici quelques faits précis :

— C'est l'importance de sa surface qui détermine l'adsorbabilité du charbon (68, p. 11). Il est évident que cette « porosité » dépend en majeure partie des traitements d'ordre physique et chimique que l'on fait subir au charbon.

— Dans le cas du charbon, il s'agit d'une adsorption apolaire, puisqu'elle est indépendante de la charge électrique du corps adsorbé (74). Le charbon adsorbe donc la molécule, non dissociée.

— L'affinité de diverses substances pour le charbon peut être caractérisée par le « volume spécifique de rétention », c'est-à-dire le volume de liquide à employer par gramme d'adsorbant pour entraîner la substance adsorbée sur la colonne. Cette notion de volume de rétention fut introduite par Tiselius (101, 102) qui a réuni en un tableau comparatif les valeurs concernant quelques acides aminés.

TABLEAU I

Volumes spécifiques de rétention en ml par g de charbon actif.

(Milieu : solution NaCl 0,1 m). (101,102).

Glycocolle	0	Isoleucine	9,2
Alanine	0,3	Méthionine	12,4
Oxyproline	1,9	Histidine	15,0
Proline	2,5	Arginine	40,4
Valine	3,2	Phénylalanine	62,5
Leucine	7,7	Tryptophane	76,5

En examinant le tableau I, il apparaît que la phénylalanine et le tryptophane sont retenus beaucoup plus fortement sur charbon que les autres acides aminés, puisqu'il

faut employer plus de solution de NaCl pour les détacher de la colonne.

Le charbon a été utilisé tout d'abord par Tiselius et ses collaborateurs pour « l'analyse frontale » (103, 104, 20, 21). Cette méthode consiste à verser sur une colonne de charbon le mélange des corps à étudier et à faire couler à travers la colonne un solvant déterminé ; on mesure à la sortie l'indice de réfraction des corps élués. On obtient ainsi une courbe indiquant les concentrations des substances éluées successivement, en fonction du volume d'éluat. Pour favoriser l'élu-tion des substances adsorbées et surtout pour éviter qu'elles « traînent », Tiselius a imaginé par la suite le « développement par déplacement » (105, 106) : on verse sur la colonne, au lieu de solvant, la solution d'une substance fortement adsorbée, (par exemple phénol, éphédrine), capable de déplacer successivement tous les corps adsorbés selon leur volume spécifique de rétention (v. tableau I).

Le charbon a été beaucoup utilisé pour l'adsorption des acides aminés aromatiques qui ont une grande affinité pour cet adsorbant (v. tableau I).

Wachtel et Cassidy (120) ont effectué sur charbon la séparation de glycine et leucine, et de phénylalanine et tyrosine. Schramm et Primosigh (87) adsorbent sur charbon les acides aminés aromatiques et les séparent quantitativement des autres acides aminés en lavant la colonne par une solution d'acide acétique à 5 %. Turba, Richter et Kuchar (115) se servent du charbon pour adsorber non seulement la phénylalanine et la tyrosine, mais aussi pour séparer la valine de la leucine et la valine de la méthionine. D'après ces auteurs, il est aussi possible de séparer sur charbon les peptides des acides aminés, ces premiers étant plus fortement adsorbés.

Turba, Richter et Kuchar (115) ont effectué également l'adsorption spécifique de tryptophane sur la *Wofatite M*.

Amidon. - Moore et Stein (75), en étudiant la chromatographie de partage sur amidon en tant que support des phases (v. p. 16), se sont aperçus qu'il présente des propriétés adsorbantes. Cette adsorbabilité, gênante quand il s'agit de la chromatographie de partage, peut être utilisée pour la séparation de certains acides aminés. Moore et Stein ont réussi ainsi à séparer quantitativement l'alanine de la glycine et la leucine de la phénylalanine et du tryptophane, par adsorption en solution aqueuse sur une colonne d'amidon.

2° - Chromatographie par échange d'ions.

Le processus de l'échange d'ions semble de prime abord appartenir plutôt au domaine d'adsorptions d'ordre chimique que physique. Cependant, comme nous le verrons plus loin, en ce qui concerne l'alumine acide, la surface de l'adsorbant joue un rôle au moins aussi important que son pouvoir permutoïde.

Le principe de l'échange d'ions a été découvert, il y a environ 100 ans, par le chimiste anglais J. Thomas Way. Il constata que l'élimination de l'ammoniaque des solutions aqueuses passées à travers certaines terres, était due réellement à un échange avec le calcium d'un type particulier de silicate, présent dans ces terres (5).

Cette méthode a trouvé tout d'abord une application dans la purification des eaux industrielles par les zéolithes naturelles. De nombreux adsorbants naturels ont été substitués en partie par des résines synthétiques standardisées, et utilisées actuellement aux Etats-Unis sur l'échelle industrielle. Sans avoir la prétention de vouloir énumérer tous les échangeurs d'ions et les méthodes préconisant leur utilisation, nous nous bornerons à en indiquer ici les plus importants, en insistant sur ceux qui nous ont servi en particulier dans notre travail.

a) Précipités minéraux.

Alumine : Deux faits semblent acquis en ce qui concerne la chromatographie sur alumine de substances ionisables. Ce sont :

1° - La nécessité de la présence d'ions autres que l'alumine.

2° - La nécessité d'une surface développée.

Schwab et Jockers (91) ont pu mettre en évidence la présence des ions Na^+ dans l'alumine commerciale Merck. Ces auteurs, en faisant adsorber des corps minéraux sur une colonne d'alumine Merck, ont constaté que seuls les cations sont retenus.. Cette adsorption est due à un échange permutoïde entre les ions Na^+ de la phase solide et les cations du produit à adsorber.



Siewert et Jungnickel (93) en lavant l'alumine Merck par une grande quantité d'eau, ont pu mettre en évidence dans le filtrat la présence de carbonate et bicarbonate alcalins. Ces alcalis représenteraient donc la capacité d'échange de l'alumine, en relation avec ses propriétés permutoïdes. En effet, l'alumine débarrassée par lavage prolongé de ses

ions Na^+ perd toutes ses propriétés adsorbantes vis à vis des corps ionisés.

Schwab et Dattler (90) en traitant l'alumine Merck par un acide minéral dilué ont pu recueillir dans le filtrat le sel de sodium de cet acide. Sur la colonne d' « alumine acide » ainsi constituée, ils ont pu adsorber les anions comme c'était le cas pour les cations sur la « colonne basique ».

D'après Wieland (122), les ions Na^+ de l'alumine sont remplacés par traitement acide par les ions H^+ , mais l'alumine étant un corps amphotère, en milieu légèrement acide l'anion aluminate peut devenir cation :



La réaction d'échange avec les anions devient alors :



En résumé, la quantité de corps adsorbés en chromatographie minérale, est en relation avec le contenu en alcali ou en acide de l'alumine.

Le pouvoir permutoïde de l'alumine ne suffit pas toutefois à rendre compte de son comportement si l'on ne fait pas intervenir la surface d'adsorption. Vervey (119) a déjà démontré théoriquement qu'en considérant le grand pouvoir adsorbant de l'alumine, il était impossible que ses particules présentent un aspect sphérique. Avec Teichner (58) nous avons remarqué que deux aluminas provenant de sources différentes : Prolabo et Obléon, « activées » de la même façon par HCl dilué, présentaient des pouvoirs adsorbants très différents : la capacité d'adsorption de l'alumine Prolabo étant environ 30 fois plus grande que celle de l'alumine Obléon. Nous avons alors déterminé la surface de deux aluminas par la méthode d'adsorption de l'azote à $-195^\circ 5$. A cette température, nous obtenons, d'après Brunauer, Emmett, Teller (14), l'isotherme d'adsorption multimoléculaire en forme de S, à partir de laquelle il est possible de calculer le volume de gaz adsorbé en couche monomoléculaire sur le corps étudié, donc la surface de ce corps. La surface obtenue pour l'alumine Prolabo est de 90 M^2 par gramme, celle de l'alumine Obléon de 6 M^2 par gramme, donc 15 fois plus faible. L'alumine Prolabo doit donc être constituée par les particules dont la structure est en éponge, tandis que l'alumine Obléon est probablement formée de grains sphériques.

Wieland a appliqué les expériences de Schwab et ses col-

laborateurs aux ions organiques. Il a démontré que l'« alumine basique » adsorbe spécifiquement par un échange de cations l'arginine et la lysine, tandis que l'histidine et les acides monoaminés monocarboxyliques traversent la colonne sans aucune rétention (122). Kuhn et Wieland ont introduit l'« alumine acide », traitée par HCl dilué (ou anionotrope) comme adsorbant des acides monoaminés dicarboxyliques (61). Dans ces conditions, la cystine reste également adsorbée, à cause de son insolubilité au pH de l'expérience (4-5), et il est possible de la séparer des acides dicarboxyliques par élution au moyen d'eau saturée d' H_2S (124). Les acides dicarboxyliques peuvent être élués par les solutions alcalines ($NaOH$, $Ba(OH)_2$), par certains sels (phosphates) soit, comme nous l'avons constaté, par des solutions acides (HCl). Wieland donne quelques exemples d'application de ses méthodes pour la séparation en trois groupes des hydrolysats de protéines (123). Il a réussi plus tard à séparer l'acide aspartique de l'acide glutamique par une élution spécifique de ce dernier au moyen de l'acide acétique 0,5 N (126).

Turba et Richter (114) ont utilisé une alumine « acide » activée par un tampon N acide acétique-acétate (pH 3,3) pour adsorber les acides dicarboxyliques et pour les séparer ensuite sur une nouvelle colonne en éluant spécifiquement l'acide glutamique au moyen de tampon N acide acétique (pH 3,3).

L'alumine acide a trouvé aussi l'application dans la séparation des acides monoaminés monocarboxyliques. Wieland (123) a montré que l'alumine acide adsorbe les sels de sodium de tous les acides aminés en solution dans l'alcool à 80-90 %. Les acides aminés acquièrent dans ces conditions une charge négative et peuvent être séparés par exemple du glucose. Turba, Richter et Kuchar (115) ont utilisé l'alumine acide activée par l'acide acétique N pour séparer en solution alcoolique à 50 % la cystine de l'alanine, la valine, la leucine et la proline, et ensuite pour séparer la proline de l'alanine.

Schramm et Primosigh (87, 88) ont étudié l'adsorption d'acides aminés neutres en présence de formol. Seuls, le glycocolle, la sérine, la thréonine et la cystéine sont adsorbés sur une colonne d'« alumine acide » en présence de formol à 10 %, tandis que les autres acides aminés neutres passent à travers la colonne sans être retenus. L'élution des acides aminés adsorbés s'effectue en milieu alcalin. En colorant la colonne d'alumine acide au préalable par un acide faible, comme par exemple le bleu de bro-

mothymol, le rouge de méthyle, il est possible d'observer la formation le long de la colonne, des anneaux blancs correspondant aux acides aminés qui, adsorbés plus fortement, déplacent le colorant (89).

Lederer et Tchen Pau Kiun (62) ont utilisé l'alumine acide pour adsorber des di- et tripeptides, en même temps que le glyco-colle, la sérine, la thréonine, la cystéine et la β -alanine dans le formol à 10 %.

Gel de silice : Une mise au point s'impose au sujet de la classification du gel de silice dans la catégorie des échangeurs d'ions. Notre étude du mécanisme d'adsorption due à cet adsorbant, n'étant pas aussi complète que celle de l'alumine, nous ne pouvons que suivre l'exemple du mode de classification adopté par d'autres auteurs. Or, aussi bien Martin et Synge (71) que Tiselius (108), classent le gel de silice dans la catégorie des échangeurs d'ions. Tiselius dit notamment à la p. 86 de son article : « *Most of the natural ion exchangers are cations exchangers, for example aluminium oxide, aluminium hydroxide, silica gel and zeolites* ». Si l'on considérait évidemment le gel de silice comme étant de la silice pure, SiO_2 , on verrait mal à première vue comment on peut appliquer le principe d'échange d'ions à cet adsorbant. Il est à noter cependant que pour préparer le gel de silice, on le précipite à partir du silicate de soude. Il est possible que, dans ces conditions, malgré plusieurs lavages par les liqueurs acides, les ions Na^+ ne soient pas complètement éliminés et qu'ils soient responsables du pouvoir permutoïde cationique du gel de silice. De sorte que par analogie avec le cas de l'alumine basique, on pourrait écrire :



Ceci constituant évidemment une hypothèse.

Il convient de souligner ici la différence fondamentale qui existe entre l'utilisation d'un gel de silice dans le présent travail et l'utilisation qui en a été faite par Martin et Synge (70). Ces derniers ont employé ce gel comme support de la phase aqueuse dans la chromatographie de partage concernant les acides aminés acétylés, support ne devant présenter, vis à vis de ces substances, aucun pouvoir d'adsorption. (Voir chromatographie de partage, p. 14). Dans le présent travail au contraire, ce gel est destiné à l'adsorption d'acides aminés basiques pour lesquels il n'est pas question d'acétylation.

Le gel de silice a été utilisé par Schramm et Primosigh (88) pour adsorber spécifiquement les bases hexoniques ;

l'éluion se fait par HCl. Pour rendre l'adsorption des bases visibles, ils ont proposé de colorer préalablement la colonne de silice avec une solution d'un sel de Co^{++} (89).

Terre à foulon : Le Filtrol-Neutrol et la Floridine XXF ont été utilisés par Turba (113) pour adsorber quantitativement l'arginine, la lysine et l'histidine et les séparer entre elles. Dans le même but, Bergdoll et Doty utilisent : « Lloyds Reagent », un genre de terre à foulon (8). Le Filtrol-Neutrol a été aussi utilisé par Turba (115) et ses collaborateurs pour séparer la proline, l'alanine et la glycine de la valine et la leucine en utilisant l'alcool à 50 % à pH 5,5 pour laver la colonne.

D'autres précipités minéraux tels que TiO_2 (98), Ag_2S (54) SO_4Ba (100) ont été utilisés avec plus ou moins de succès par différents auteurs pour l'adsorption des acides aminés.

b) Résines synthétiques.

L'invention des résines synthétiques est due à Adams et Holmes (1). Leur nombre et leurs applications sont considérables.

Pour adsorber les acides aminés basiques, Block (10) s'est servi d'Amberlite IR-100. Récemment Winters et Kunin (132) ont réussi à séparer quantitativement les trois bases hexoniques entre elles en se servant d'Amberlite IR C-50 et d'Amberlite IR A-400. Les résines d'origine allemande, genre Wofatite, ont trouvé des applications analogues. La Wofatite C, portant des groupements acides faibles : COOH , a servi pour adsorber les acides aminés basiques, tandis que les Wofatites K et KS, contenant des groupements acides relativement forts : SO_3H , adsorbent tous les acides aminés sous forme de cations (44, 109, 128).

Pour l'adsorption des acides dicarboxyliques, Cannan (17) a utilisé la résine du type polyamine-formaldéhyde : Amberlite IR-4 qui, depuis, a été utilisée dans le même but par de nombreux auteurs (32, 109).

Freudenberg et Coll (44) proposent l'utilisation de la Wofatite M pour adsorber les acides aminés acides.

Partridge et Coll se servent d'un échangeur d'ions synthétique Zeo-Karb 215 (Permutite C° Ltd London) pour séparer soit divers acides aminés et bases organiques (7,79) soit pour fractionner un hydrolysate protéique en 5 groupes d'acides aminés (78). Dans ce but les auteurs anglais appliquent à cet échangeur d'ions la technique du « développement par déplacement », utilisée par Tiselius dans les séparations sur charbon (v. p. 8).

3° - Chromatographie de partage.

La chromatographie de partage a été inventée par Martin et Synge (70). Elle consiste à faire passer la solution des substances à analyser à travers une colonne constituée par un corps inerte servant de support pour la phase aqueuse (phase stationnaire). On « développe » le chromatogramme en faisant couler à travers la colonne une phase solvant non miscible avec la première (phase mobile). Dans ces conditions, il se fait constamment un partage entre les deux phases liquides et c'est la solubilité des substances analysées dans la phase mobile qui détermine leur vitesse de déplacement à travers la colonne.

Gel de silice : Martin et Synge ont effectué la séparation de plusieurs acétylamino-acides en se servant de gel de silice comme support de la phase aqueuse, colorée par le méthyl orange, et de chloroforme comme phase mobile. Le passage de différents acétylamino-acides est marqué par l'apparition d'une bande blanche sur un fond rose de méthyl orange. Plus tard, Gordon, Martin et Synge ont appliqué cette méthode aux hydrolysats des différentes protéines et ont introduit d'autres solvants : butanol, propanol, cyclohexane (50, 51, 52, 70).

D'autres colorants, comme les anthocyanines, ont été utilisés avec succès à la place du méthyl orange comme indicateurs (70).

La préparation du gel de silice est une opération délicate et capricieuse, car il ne faut pas qu'il adsorbe les acides aminés acétylés (52, 112).

La méthode de Martin et Synge a vite trouvé des applications très nombreuses. Sanger (85) s'en est servi pour séparer les dérivés jaunes de N-2:4-dinitrophényle des acides aminés dans le but d'identifier les fonctions aminées libres d'insuline (85) et de gramicidine S (86). Wieland et Fremery (127) ont effectué la séparation des acides aminés en faisant la chromatographie de leurs complexes cuivriques bleus.

La chromatographie de partage a été aussi appliquée à la séparation des acides organiques (35, 94, 82, 83), des hydroxyacides à partir des fruits (57) et des saccharides méthylés (6).

Papier filtre. - L'idée initiale de Martin et Synge a trouvé la plus belle application, peut-être, dans la chromatographie de partage sur papier, inventée par Consden, Gordon et Martin (22, cf. 49). Son grand avantage est qu'elle permet l'utilisation des acides aminés et des peptides sans

acétylation préalable, et en très petite quantité. Dans cette méthode, la cellulose du papier filtre sert de support des phases. On place une gouttelette contenant en solution la substance à analyser, en haut de la feuille. On plonge la feuille par sa partie supérieure dans une gouttière remplie de solvant saturé d'eau et on enferme le tout dans une cage étanche ou bien une cloche en verre. L'atmosphère de l'enceinte, ainsi constituée, est saturée des vapeurs d'eau et de solvant. Le liquide de la gouttière descend par capillarité le long de la feuille. Suivant leur coefficient de partage, les acides aminés ou les peptides se distribuent le long du parcours du solvant. On retire la feuille lorsque le liquide l'a parcourue en entier. Après l'avoir séchée, on peut la tourner de 90° et recommencer l'opération en changeant le solvant. Enfin, on sèche et on « révèle » le chromatogramme en l'arrosant avec une solution de ninhydrine dans le butanol, ou bien d'un autre réactif spécifique des composés à analyser, et en le chauffant dans un four à 90°. Les acides aminés et certains peptides donnent des taches violettes avec la ninhydrine. On obtient ainsi une « carte de répartition » des acides aminés pour un solvant ou une paire de solvants donnés (31). Chaque acide aminé est caractérisé par sa valeur du Rf :

$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

Le Rf est en relation directe avec le coefficient de partage. Les solvants les plus utilisés sont : n-butanol, phénol, collidine, alcool benzylique. Les quantités de substances à analyser peuvent être très petites : 0,2-0,4 mg d'un hydrolysat protéique pour un chromatogramme bidimensionnel, 1 à 2 µg d'acide aminé individuel pour un chromatogramme unidimensionnel. La chromatographie sur papier a servi à identifier les acides aminés dans plusieurs protéines et polypeptides naturels, ainsi que dans les liquides et tissus biologiques. Il n'est pas dans notre but de citer d'innombrables variantes des applications de la chromatographie sur papier ; nous nous contenterons seulement d'en donner quelques exemples.

Dent a analysé les acides aminés dans le jus de pommes de terre (30) et dans l'urine pathologique (29). Tischkoff et Coll ont déterminé les acides aminés dans un extrait de foie (110) et dans la salive (48). La méthode a été adaptée par la suite par Consden, Gordon et Martin (23) à l'identification des peptides provenant de l'hydrolyse partielle des

protéines. Ils ont examiné de cette façon les hydrolysats partiels de gramicidine S (24) et de la laine (72).

La chromatographie sur papier a été aussi appliquée aux dosages des sucres (77, 38, 56, 41), acides organiques (65), penicillines (131), etc.

Tout d'abord qualitative, la chromatographie sur papier a été rendue progressivement semi-quantitative, et finalement quantitative. Les méthodes quantitatives sont nombreuses, elles consistent en :

— La formation de complexes du cuivre avec les acides aminés (133, 73, 129).

— L'extraction de la coloration donnée avec de la ninhydrine, et la colorimétrie (81, 76).

— La mesure de la surface des taches (37, 13) et de la transmission de la lumière à travers les taches (15).

Il convient de citer ici particulièrement les travaux de Block (11) qui, après avoir séparé un hydrolysat protéique en fractions : acide, basique et neutre, par adsorption sur des résines synthétiques, appliqua à chacune d'elles la méthode de chromatographie quantitative sur papier qui consiste à mesurer la densité optique des taches, obtenues en traitant la feuille par une solution de ninhydrine.

Amidon : Elsdén et Synge (34) ont employé l'amidon en colonne, comme support de la phase aqueuse, ce qui a permis d'utiliser les acides aminés non acétylés. Synge (99) a appliqué cette méthode à l'analyse des hydrolysats partiels de gramicidine. Moore et Stein (75, 97) ont développé considérablement cette technique et l'ont rendue quantitative.

DEUXIÈME PARTIE

Dans le but d'étudier la composition d'hydrolysats totaux et partiels de protéines, nous avons cherché à mettre au point une méthode de séparation chromatographique des acides aminés et des peptides tout d'abord en les quatre groupes suivants :

- I. - Composés basiques
- II. - Composés acides
- III. - Composés neutres aromatiques
- IV. - Composés neutres non aromatiques.

Ce dernier groupe devant donner lieu ultérieurement à des séparations plus fines :

Acides aminés et peptides
neutres non aromatiques

▼
Glycine, sérine, thréonine,
 β -alanine, cystéine, *peptides*

▼
Acides aminés neutres non
aromatiques restant (leu-
cine, valine, proline, etc...)

▼
Glycine, sérine, thréo-
nine, cystéine, β -ala-
nine, alanyl-leucyl-
peptides, etc.

▼
Glycyl-, séryl-, thréo-
nyl-, cystéyl-peptides.

L'intérêt d'une telle méthode a été souvent souligné par différents auteurs et notamment par Tristram (112), d'après lequel « *a further improvement might be effected, if the method (il s'agit de la chromatographie de partage des acides aminés neutres) could be used in conjunction with a procedure... which would yield the monoaminoacids quantitatively and relatively free from other aminoacids* » ; par le travail de Sperber (96) qui propose une technique combinant l'adsorption de l'ionophorèse, et par la communication de Tiselius, Drake et Hagdahl (109), concernant la séparation par groupes des acides aminés libres par adsorption. Block (11) a effectué tout d'abord la séparation chromatographique d'un hydrolysât protéique en trois groupes, avant de procéder à une analyse spécifique des acides aminés dans chacun de ces groupes au moyen de la chromatographie quantitative sur papier (v. p. 16).

En ce qui concerne la séparation en groupes des acides aminés libres, rappelons que Schramm et Pimosigh (88) ont réussi les séparations suivantes : adsorption des acides aminés aromatiques sur charbon, des bases hexoniques sur gel de silice « Merck », des acides aminés dicarboxyliques sur alumine acide, et, finalement, des acides neutres en deux groupes grâce à une adsorption sélective sur alumine acide dans le formol à 10 %.

Pour fixer le choix de nos adsorbants, nous nous sommes imposés un certain nombre de conditions :

1° - Adsorbant facile à préparer ou à se procurer : la plupart des adsorbants utilisés par les différents auteurs, surtout les résines synthétiques, sont encore actuellement rares en France, d'autres difficiles à préparer.

2° - Adsorbant spécifique pour certains groupes d'acides aminés et de peptides, donnant des résultats facilement reproductibles, et ne contenant pas d'impuretés, capables de se dissoudre dans les solvants utilisés et de contaminer les produits dont on fait la chromatographie. Les précipités minéraux, tels que l'alumine et la silice, nous ont paru supérieurs à ce point de vue aux résines synthétiques. Ces dernières ayant, certes, une capacité d'adsorption supérieure aux précipités minéraux, mais contenant des impuretés organiques souvent difficiles à éliminer (108).

3° - Adsorbants applicables non seulement aux mélanges synthétiques, mais aussi aux hydrolysats de protéines, car si plusieurs auteurs avaient proposé déjà des méthodes de séparation des acides aminés en groupes, aucun jusqu'ici n'était arrivé à appliquer ces méthodes à l'analyse proprement dite d'une protéine. Or, comme nous le verrons plus

loin, lorsque l'on passe de l'étude d'un mélange d'acides aminés synthétiques à celle d'un mélange d'acides aminés provenant de l'hydrolyse d'une protéine, on se heurte à des difficultés considérables. Ce sont ces difficultés que nous nous sommes efforcées de résoudre entre autres choses.

Dans cette partie de notre travail, nous avons étudié et mis au point une série de chromatographies permettant la séparation des acides aminés et des peptides en quelques groupes spécifiques. En outre, dans chacun de ces groupes, nous avons effectué un certain nombre de dosages spécifiques pour contrôler l'efficacité de nos séparations.

I. - Adsorption des dérivés basiques sur gel de silice.

A) Préparation de l'adsorbant

Nous avons choisi le gel de silice, tout comme Schramm et Primosigh (88) pour adsorber des bases hexoniques et des peptides basiques. Le gel de silice nous a paru supérieur aux autres adsorbants, parce qu'il est facile à préparer et ne change pas ses propriétés d'une préparation à l'autre, et qu'il est facile à purifier, ne se colmate pas dans la colonne, et ne retient pas trop fortement les substances adsorbées, ce qui permet de les éluer sans difficulté.

Nous avons mis au point la préparation d'un gel de silice en nous basant en partie sur les indications concernant la préparation d'un tel gel pour la chromatographie de partage (50, 112, 55). Nous insistons encore une fois sur le fait, comme nous l'avons déjà dit dans la première partie de ce travail, que le gel préparé par nous sert à un emploi différent de celui des auteurs anglais (v. p. 14).

a) *Précipitation* - On place dans un récipient en verre de 20 litres 10 kg de silicate de soude commercial (40-42° Bé), que l'on mélange à 5 litres d'eau ordinaire. On ajoute ensuite lentement, et en agitant vigoureusement, environ 6 litres d'acide chlorhydrique 6 N. Quand on a ajouté environ 1 litre d'acide, le gel formé se prend en masse ; on le pilonne avec un tampon en bois et on brasse le tout énergiquement en continuant d'ajouter peu à peu l'acide chlorhydrique. Le gel se liquéfie de plus en plus jusqu'à prendre l'aspect d'une fine granulation. On arrête l'addition d'acide chlorhydrique, lorsque le mélange devient acide de façon permanente (pendant au moins une heure) au bleu de bro-

mothymol (pH 2 à 2,8). On cesse l'agitation et on laisse la suspension se reposer pendant 1/4 d'heure, après quoi on décante le liquide surnageant en même temps que les particules les plus fines. On lave le gel à l'eau distillée jusqu'à l'élimination complète de NaCl (test négatif avec NO_3Ag , ce qui est atteint au bout de 5 à 6 fois), en laissant reposer chaque fois et en décantant sans hésitation la suspension contenant les particules trop fines qui, ultérieurement, pourraient colmater la colonne.

b) *Traitement par HCl* - On mesure approximativement le volume du gâteau de silice ainsi obtenu, et en admettant qu'il contient 50 % d'eau on ajoute une quantité d'acide chlorhydrique telle que le titre final de la suspension soit 0,2 N en HCl. On s'arrange pour avoir finalement une suspension dont le volume serait le double du volume initial du gâteau. On abandonne à la température du laboratoire pendant 48 heures. Après cela, on décante et on lave à l'eau distillée par décantations successives jusqu'à ce que le pH des eaux de lavage soit voisin de 6. On sèche le gel à la température ordinaire en le disposant en couches minces sur le papier filtre. On obtient 2 à 3 kg de silice apparemment sèche.

c) *Élimination des impuretés*. - Le gel de silice ainsi préparé contient des quantités d'azote non négligeables (environ 100 μ g/g). L'élimination de la majeure partie des impuretés se fait de la façon suivante : 100 g du gel de silice en question sont traités pendant 50 heures environ par 500 ml d'acide acétique à 20 % *) ; on le recueille ensuite sur bûchner puis on le remet en suspension dans de l'eau bouillante, et on lave par décantations et mises en suspension successives jusqu'à ce que le liquide surnageant soit à pH 6. Au cours de ce lavage, on élimine encore les particules de silice trop fines. On sèche le gel à l'étuve à 110° pendant 6 heures, **) on le broie dans un mortier en porcelaine et tamise à travers un tamis n° 50. Le gel ainsi obtenu est un bon adsorbant pour les bases, mais il contient souvent encore un peu d'azote (environ 20 μ g/g). Le traitement de ce gel en colonne, par l'acide chlorhydrique 0,1 N tel qu'il est indiqué ci-dessous, permet de se débarrasser de toute trace d'azote.

*) Il convient de noter que le traitement du gel de silice par l'acide acétique à 20 % constitue également une sorte d'« activation ». Nous avons constaté en effet que le gel, non traité par l'acide acétique, atteint à peine 75 % de la capacité d'adsorption acquise après ce traitement.

**) Le chauffage de ce gel à 250° C., d'après Harris et Wick (55) diminue légèrement ses propriétés adsorbantes.

B - Adsorption des bases hexoniques et des peptides basiques

Deux cas se présentent quand on veut effectuer une adsorption des bases hexoniques et des peptides basiques sur gel de silice : celui d'un mélange synthétique ne contenant pas ou très peu de sel minéral, et celui d'un hydrolysât protéique acide, accompagné d'une certaine quantité d'acide chlorhydrique retenu sous forme de chlorhydrates d'acides aminés et qu'il est nécessaire de neutraliser. Nous étudions en détail cette question plus loin, dans le même chapitre (voir : Influence des sels sur l'adsorption par le gel de silice). Nous attirons seulement ici l'attention sur le fait que, pour neutraliser l'acide chlorhydrique subsistant, nous utilisons de l'hydroxyde de lithium. La quantité de chlorure de lithium formé dans ces conditions correspond à environ 70 mg pour 100 mg d'une protéine hydrolysée.

a) *Cas d'un mélange d'acides aminés ou de peptides synthétiques* - On prépare une colonne avec 6 g du gel de silice précédent, et d'un diamètre de 18 mm. Cette colonne est tout d'abord lavée par 50 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N puis par 100 ml d'eau ; de toute façon, le pH des dernières gouttes de l'eau de lavage doit être compris entre 5,5 et 6,0. On verse ensuite sur la colonne 5 à 10 ml d'une solution neutralisée par l'hydroxyde de lithium (pH 7) contenant environ 20 mg de bases hexoniques ou de peptides basiques. On lave la colonne par 45 à 50 ml d'eau ce qui fait passer quantitativement les substances acides et neutres dans le filtrat. L'élution des bases adsorbées se fait quantitativement par lavage de la colonne avec 100 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N. Le dosage colorimétrique de l'histidine et de l'arginine peut se faire directement dans la liqueur d'élution.

La même colonne de silice peut servir plusieurs fois pour l'adsorption des substances basiques, l'élution par HCl 0,1 N constituant en même temps une sorte de régénération. Il est nécessaire de l'amener simplement par un lavage à l'eau distillée à un pH compris entre 5,5 et 6,0 et de la garder toujours recouverte d'eau. Nous avons vérifié que la même colonne de silice peut ainsi servir au moins pour trois adsorptions successives.

b) *Cas d'un hydrolysât chlorhydrique total.*

100 mg d'une protéine sont hydrolysés par 2 à 3 ml d'acide chlorhydrique 5,5 N à l'ébullition, ou mieux en tube scellé et à 110°, pendant 24 heures. L'hydrolysât est ensuite évaporé 3 fois à sec, après additions successives d'eau distillée, dans un dessiccateur, sous vide, à la température or-

dinaire, en présence de chaux sodée. L'acide chlorhydrique subsistant est neutralisé et le milieu légèrement alcalinisé (coloration franchement rose avec la phénolphtaléine) par la lithine 0,1 N et l'on chasse l'ammoniac par entraînement à la vapeur d'eau, sous vide, à 45°. On doit obtenir ainsi 20 à 40 ml d'une solution que l'on ramène à pH 7 par quelques gouttes d'acide chlorhydrique 0,1 N.

On prépare une colonne de 35 g de silice et de 25 mm de diamètre ; on la lave par 200 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N puis par 200 ml d'eau ; on vérifie que le pH des dernières gouttes de l'eau de lavage est bien compris entre 5,5 et 6,0. On verse ensuite sur cette colonne 20 à 40 ml de la solution à analyser, préparée comme il vient d'être dit. On lave la colonne par 250 ml d'eau pour faire passer quantitativement les substances acides et neutres dans le filtrat. L'élution des bases adsorbées se fait par lavage de la colonne avec 200 ml d'acide chlorhydrique 0,1 N.

Nous avons traité comme il vient d'être dit toute une série de solutions contenant les unes uniquement des bases hexoniques ou des peptides basiques, les autres des mélanges de bases hexoniques ou de peptides basiques et d'acides aminés dicarboxyliques ou neutres, les autres enfin de mélanges d'acides aminés neutres et acides. Parmi ces dernières solutions, l'une (essai 5) renferme les acides aminés neutres et acides correspondant à la partie neutre et acide d'un hydrolysât synthétique de 100 mg d'insuline, d'après Tristram (112), à savoir, en mg ; glyocolle 4,3 ; alanine 4,6 ; sérine 5,2 ; cystine 12,5 ; thréonine 2,1 ; valine 7,5 ; leucine 10,9 ; isoleucine 4,8 ; proline 2,6 ; phénylalanine 8,1 ; tyrosine 13,1 ; acide aspartique 5,7 ; acide glutamique 18,6. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau II.

TABLEAU II

Adsorption sur gel de silice

La récupération des substances est exprimée en N = azote pour 100 de l'azote de la solution initiale.

Sp = dosage spécifique de la carnosine par la réaction de Pauli (67).

N° des essais	Substances non adsorbées (mg)	% dans le filtrat	Substances adsorbées (mg)	% dans l'éluat
		N		N Sp
A - Solutions ne contenant que des substances appartenant à un même groupe				
1	—	0	Arginine 12,8	97
2	—	0	Lysine 2 HCl 6,05	99
3	—	0	Histidine HCl 19	102
4	—	2,1*	Arginine 2,95 + Lysine 2 HCl 3,70 + Histidine HCl 6,05	97
5	Partie acide + neutre d'un hydrolysate synthétique de 100 mg insuline	99	—	0,8
6	—	1,8*	Carnosine 5	98
7	—	2 *	Ac. lysyl-glycyl-glycyl-glutamique 5	99

B - Solutions contenant des substances appartenant à des groupes différents.

8	Acide glutamique 20	97	Arginine 10 + Histidine HCl 10		98
9	Alanine 2	99	Carnosine 2		99,5 101

*) Dû à des impuretés non basiques.

*) Correspondant à la partie basique de 200 mg d'insuline.

Les chiffres du tableau II montrent que : 1° les trois bases hexoniques ainsi que la carnosine, adsorbées sélectivement, sont quantitativement récupérées dans l'éluat ; 2° les acides aminés acides ou neutres traversent la colonne sans aucune rétention ; 3° l'acide lysyl-glycyl-glycyl-glutamique (essai n° 7) également adsorbé sur une colonne de silice, présente un cas particulier d'adsorption par le gel de silice d'un peptide à la fois basique et acide. On peut penser que l'éloignement des fonctions : carboxyliques et aminées est suffisant pour qu'elles n'exercent aucune action ionique les unes sur les autres. Cette hypothèse se trouve confirmée par le fait que le même peptide est également adsorbé sur l'alumine acide, tout comme les peptides acides

(voir chapitre suivant) ; il ne s'agit donc pas d'un corps neutre par compensation comme c'est le cas pour les « Zwitterions ».

C. - Influence des sels sur l'adsorption par le gel de silice

L'application des méthodes précédentes à des hydrolysats chlorhydriques de protéines se heurte à l'influence du chlorure de sodium résultant de la neutralisation de l'acide chlorhydrique retenu sous forme de chlorhydrates. Cette influence, déjà constatée par Schramm et Primosigh (88) se manifeste par le fait que l'adsorption des bases hexoniques sur le gel de silice n'est pas complète (Tableau III).

Le phénomène de l'influence des sels minéraux sur l'adsorbabilité des bases hexoniques s'explique aisément si l'on admet qu'en plus de l'adsorption vraie il s'agit d'un échange de cations sur le gel de silice. Il est évident que les cations minéraux seront adsorbés de préférence par le gel et de ce fait déplaceront les cations organiques faibles, tels que les bases hexoniques qui vont passer dans le filtrat. C'est pour cela qu'il faut débarrasser soigneusement les solutions à analyser de toute trace d'ammoniac qui, adsorbé de préférence aux bases hexoniques, risquerait de causer de sérieux inconvénients.

Nous avons résolu la difficulté provoquée par la présence de sels en neutralisant l'acide chlorhydrique, non plus par la soude mais par la lithine.

Les chiffres du tableau III montrent qu'en combinant la neutralisation du milieu par la lithine et l'utilisation d'une colonne de silice plus longue, il est possible de réaliser une adsorption totale et spécifique des bases hexoniques même en présence de 70 mg de chlorure de lithium ; c'est la quantité approximative que l'on atteint quand on a affaire à un hydrolysat de 100 mg d'une protéine.

TABLEAU III

Influence des sels sur l'adsorption des bases hexoniques par le gel de silice

La solution étudiée contient le mélange de bases hexoniques correspondant à 100 mg d'insuline (v. Tableau I).

La colonne de gel de silice a un diamètre de 18 mm dans le cas de 6 gr et de 10 gr de silice, et de 25 mm dans les autres cas.

Silice (g)	Sel présent (mg)	N non adsorbé (% de N total)
6	NaCl 100	81
6	« 10	42
6	« 5	18
6	« 2	10
6	« 1	1
10	« 5	7,4
20	« 50	36
20	« 10	3
20	KCl 50	50
20	NH ₄ Cl 64	35
20	LiCl 37	12
35	« 43	2
35	« 70	3

Rétention des acides aminés neutres par le gel de silice :

Des essais préliminaires avec des mélanges synthétiques d'acides aminés nous avaient d'abord fait croire qu'une partie des acides aminés neutres était adsorbée sur gel de silice, en présence de chlorure de lithium. Des vérifications ultérieures nous ont montré cependant que l'azote adsorbé correspondait à du chlorure d'ammonium présent comme impureté dans les acides aminés utilisés. Cette observation confirme une fois de plus la spécificité de l'adsorption sur gel de silice.

Il existe cependant une influence certaine du chlorure de lithium sur le comportement des acides aminés neutres vis à vis du gel de silice ; nous avons constaté en effet, que comme le montre le tableau IV, si la totalité des acides aminés neutres traverse sans difficulté une colonne de

35 gr et de 25 mm de diamètre quand ces acides sont en présence de 56 mg de chlorure de lithium pour 60 ml de solution, il n'en est pas de même en l'absence de ce sel. Dans ce cas, il apparaît une rétention d'une fraction importante des acides aminés en question, rétention qu'on ne peut éviter qu'en utilisant une colonne de silice beaucoup plus faible, de 6 gr d'adsorbant et de 18 mm de diamètre. Mais on a vu plus haut (Tableau III) qu'une colonne ainsi réduite, qui retient quantitativement les bases hexoniques en l'absence de tout sel (max. 1 mg de ClNa) ne suffit plus à leur adsorption quantitative en présence de chlorure de lithium.

TABLEAU IV

*Influence des sels sur le comportement
des acides aminés neutres vis à vis du gel de silice*

Colonne de 35 gr de gel de silice et de 25 mm de diamètre.

La solution étudiée contient le mélange d'acides aminés neutres correspondant à 100 mg d'insuline (v. chapitre précédent).

Liquide versé sur la colonne	% N dans le filtrat	
	Mélange sans sel	Mélange contenant 56 mg de LiCl
40 ml de la solution des acides aminés neutres suivis de 150 ml d'eau	53,2	98,2
50 ml d'eau	9,0	1,2
150 ml d' HCl 0,1 N	36,6	0,8
Total	98,8	100,2

II. - Adsorption des dérivés acides sur alumine acide.

A - Préparation de l'adsorbant.

Nous avons déjà vu dans la première partie de ce travail (p. 10) qu'en traitant l'alumine par un acide minéral dilué, on la rend anionotrope. Wieland (122) a préparé « l'alumine acide » par le traitement de l'alumine Merck par l'acide chlorhydrique N, suivi de quelques lavages à l'eau distillée pour éliminer l'excès de HCl. Nous avons constaté que si l'on traite l'alumine Prolabo d'après Wieland, elle contient encore un peu d'azote dont la plus grande partie est entraînée ultérieurement au cours de l'éluion par l'acide chlorhydrique 2N à chaud. Pour obtenir de l'alumine exempte d'azote, nous avons modifié la méthode de Wieland de la façon suivante :

250 gr d'alumine Prolabo sont traités par 1250 ml d'acide chlorhydrique 2 N à l'ébullition, pendant 20 minutes, en agitant. On verse ensuite dans une colonne de 7 cm de diamètre intérieur, puis on traite par 1250 ml d'acide chlorhydrique 2 N bouillant. On transvase dans un erlenmeyer puis on lave 4 à 5 fois avec 1 litre d'eau chaque fois, par décantations et mises en suspension successives, en éliminant chaque fois les particules d'alumine les plus fines. On sèche enfin à l'étuve à 110° pendant une dizaine d'heures.

Nous avons vérifié que les aluminés d'autre provenance : « Merck », Darmstadt ; « Aluminum Ore C^a », East St-Louis, Illinois, U.S.A., donnent également des résultats satisfaisants.

B - Adsorption des acides aminés dicarboxyliques et des peptides acides.

On prépare une colonne de 5 gr d'alumine acide (10 mm de diamètre) ; on la lave soigneusement à l'eau distillée (environ 100 ml) jusqu'à ce que le pH du liquide de lavage s'écoulant de la colonne soit aux environs de 5. Nous avons remarqué qu'une colonne plus acide retient en partie les acides aminés neutres. On verse sur la colonne, ainsi préparée, de 5 à 10 ml d'une solution saturée d'hydrogène sulfuré et neutralisée (pH 7) contenant environ 20 mg des acides aminés dicarboxyliques ou des peptides acides^o). On

^o) Nous avons vérifié que les sels et notamment NaCl en petite quantité (20 mg pour une colonne d'alumine de 10 gr) ne gênent nullement cette adsorption.

lave ensuite avec 40 à 50 ml d'eau saturée d'hydrogène sulfuré pour faire passer les acides aminés neutres et les peptides neutres dans le filtrat. L'élution des acides aminés dicarboxyliques s'effectue par 30 ml d'acide chlorhydrique 2 N à la température de 85-90° C ; celle des peptides acides est généralement quantitative déjà avec 30 ml d'acide chlorhydrique N à la température ordinaire.

Nous avons préféré ce mode d'élution à celui proposé par Schramm et Primosigh (87, 88) au moyen d'une solution de KOH N/2, puisqu'il est toujours plus facile de se débarrasser de l'acide chlorhydrique par simple distillation. Des essais effectués par nous, nous ont démontré d'autre part que pour avoir l'élution complète des acides dicarboxyliques, il est nécessaire d'utiliser de l'acide chlorhydrique 2 N à chaud.

La cystine se comporte ici de façon particulière : seule en solution, elle est quantitativement adsorbée par l'alumine acide comme un acide aminé dicarboxylique (124, v. p. 11), mais nous avons constaté qu'en mélange avec les autres acides aminés, son adsorption n'est plus quantitative. Lorsque la cystine est présente dans la solution, il convient donc, comme le recommandent Schramm et Primosigh (88) de saturer la solution d'hydrogène sulfuré pour réduire la cystine en cystéine. Cette dernière traverse la colonne avec les autres acides aminés neutres sans subir aucune rétention.

Nous avons traité comme il vient d'être dit toute une série de solutions contenant les unes uniquement des acides aminés dicarboxyliques ou des peptides acides, les autres uniquement des acides aminés neutres, les autres enfin des mélanges d'acides aminés dicarboxyliques ou de peptides acides et d'acides aminés neutres. Parmi ces solutions, l'une (essai 3) contient les acides aminés neutres correspondant à la partie neutre d'un hydrolysât d'insuline, d'après Tristram (112) dont nous avons indiqué la composition (p. 22) et une autre (essai 4) les acides aminés dicarboxyliques correspondant à la partie acide d'un hydrolysât d'insuline, toujours d'après Tristram.

Le tableau V indique quelques-uns des résultats obtenus.

TABLEAU V

Adsorption sur alumine acide

Les quantités des substances étudiées sont comprises entre 5 et 10 mg.

N = Azote d'après Kjeldahl exprimé en azote pour 100 de l'azote de la solution initiale.

Sp = Dosages spécifiques : (a) glycocolle d'après Alexander, Landwehr et Seligman (3) ; (b) phénylalanine d'après Kapeller-Adler (59) ; Radical p-aminobenzoyl par spectrographie ($\lambda = 2.500$).

N° des essais	Substances non adsorbées	% dans le filtrat		Substances adsorbées	% dans l'éluat	
		N	Sp		N	Sp

A - Solutions ne contenant que des substances appartenant à un même groupe.

1	Phénylalanine	100	—	—	0	—
2	Cystine réd. par H ₂ S	100	—	—	0	—
3	Partie neutre d'un hydrolysât synth. d'insuline	99	—	—	1.7	—
4	—	0	—	Partie acide d'un « hydrolysât synthétique » d'insuline	100	—
5	—	0	—	Glutathion *)	100	—
6	—	0	—	Acide glycyL-glutamique	98	—
7	—	3.4*)	—	Ac.p-aminobenzoyl-aspartique	97	93
8	—	6.6*)	—	Ac.p-aminobenzoyl-glutamique	93	92
9	—	6.0*)	—	Ac.lysyl-glycyl-glycyl-glutam.	94	—

B - Solutions contenant des substances appartenant à des groupes différents.

10	Phénylalanine	98	100 b)	Acide glutamique	102	0 b)
11	Phénylalanine + cystine (+ H ₂ S)	98	100 b)	Acide glutamique	100	0 b)
12	Glycocolle	95	92 a)	Acide glycyL-glutamique	105	0 a)
13	Glycocolle	99	—	Glutathion	100	—

*) Correspondant à une impureté non acide, ne donnant pas de coloration avec la ninhydrine.

*) Le glutathion étant très fortement adsorbé, il a été nécessaire pour l'éluer quantitativement d'utiliser la potasse N/2.

III. - Adsorption des dérivés aromatiques par le charbon.

Le charbon actif adsorbe les acides aminés et les peptides contenant un noyau aromatique, indépendamment de la substitution de ce dernier (88). En opérant en présence d'acide acétique à 5 %, on peut séparer quantitativement la fraction aromatique des autres acides aminés et peptides.

Le charbon a l'avantage d'être insensible aux impuretés minérales et de débarrasser l'hydrolysat, quand il est coloré, de ses pigments qui pourraient être gênants pour les dosages ultérieurs.

Le charbon étant un catalyseur d'oxydation (104), il est nécessaire, pour empêcher toute destruction à son contact des produits adsorbés, d'opérer en milieu réducteur. Nous avons préféré utiliser dans ce but de l'hydrogène sulfuré (88) qu'il est facile de chasser en fin d'opération, au cyanure de potassium (102).

L'inconvénient du charbon est sa grande affinité pour certains peptides aromatiques. Nous avons remarqué que la rétention par le charbon d'une substance aromatique est fonction de la substitution de son noyau. Schramm et Primosigh (87) avaient déjà remarqué que la tyrosine, comportant un groupement hydroxy apolaire en plus du noyau aromatique, est beaucoup plus fortement adsorbée que la phénylalanine. Cette forte rétention de certains produits par le charbon devient gênante quand il s'agit de l'élution de certains peptides. Même en utilisant de très grands volumes d'éluant, on n'arrive pas toujours à récupérer quantitativement les substances adsorbées.

L'examen du tableau VI montre qu'il suffit de 125 ml d'eau saturée d'acétate d'éthyle pour éluer quantitativement la tyrosine, alors qu'il en faut 250 ml pour le tryptophane et 375 ml pour le glycytryptophane. Même avec 300 ml de solution on n'élue que 67 % de phénylalanine-phénylalanine.

Tout se passe comme s'il existait dans le charbon des centres particulièrement actifs qui fixeraient certains produits d'une façon irréversible. C'est dans le but d'atteindre ces centres et pour désactiver partiellement le charbon, que nous lui faisons subir un traitement à l'éphédrine, celle-ci ayant l'avantage d'être plus fortement retenue par adsorption (107) que le phénol utilisé dans le même but par

TABLEAU VI

Affinité du charbon pour les différents peptides

L'élution se fait par des volumes variables d'eau saturée d'acétate d'éthyle. Colonne 0.5 gr. d'Activit 50 X P. Les quantités de substances étudiées sont comprises entre 8 et 10 mg.

N° des essais	Substance adsorbée	ml d'eau saturée d'acétate d'éthyle pour l'élution	% retrouvé par rapport à la quantité initiale
1	Tyrosine	125	100
2	Glycyl-tyrosine	150	99,8
3	Leucyl-tyrosine	180	96,8
4	Cystyl-tyrosine	250	100
5	Tryptophane	250	100
6	Glycyl-tryptophane	375	101
7	Phénylalanyl-phénylalanine	300	67

Schramm et Primosigh (87). Il est vraisemblable que l'éphédrine agit en venant se fixer irréversiblement sur ces points particulièrement actifs pour les rendre inaccessibles aux autres composés. Rappelons à ce sujet que Tiselius a utilisé l'éphédrine pour l'élution différentielle de divers sucres (106) et de peptides (107), par déplacement.

A. - Préparation de l'adsorbant :

On fait bouillir 0,5 gr. d'Activit 50 XP *) pendant 5 minutes avec 4 ml d'acide acétique à 20 %. On filtre, puis on lave sur le filtre avec 15 ml d'eau chaude ; on fait ensuite passer le charbon dans un bécher où on le traite par 10 ml d'eau contenant 2 mg de l'éphédrine. On agite pendant 10 minutes, puis on verse la suspension de charbon dans une colonne de 10 mm de diamètre intérieur. La colonne d'adsorbant ainsi formée est lavée successivement avec 15 ml d'eau saturée d'hydrogène sulfuré et avec 35 ml d'une solution d'acide acétique à 5 % saturée d'hydrogène sulfuré.

*) Cie Activit, 66, rue d'Auteuil, Paris XVI.

B. - Adsorption des acides aminés aromatiques et des peptides aromatiques :

Le mélange correspondant à 20 à 30 mg de substances aromatiques dissoutes dans 10 ml d'une solution d'acide acétique à 5 % saturée d'hydrogène sulfuré, est versé sur la colonne ; celle-ci est ensuite lavée avec 25 ml de la solution d'acide acétique à 5 %, saturée d'hydrogène sulfuré. Les substances non aromatiques passent ainsi quantitativement dans le filtrat. Quand à la fraction aromatique adsorbée, elle est quantitativement éluée, dans le cas de la plupart des substances aromatiques, par 125 ml d'eau saturée d'acétate d'éthyle et d'hydrogène sulfuré. Toutefois, le tryptophane libre nécessite pour son élution 225 ml, et le glycytryptophane jusqu'à 375 ml du même liquide ^{°)}. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau VII.

Il apparaît d'après les chiffres du tableau VII que : 1° - les acides aminés aromatiques et les peptides contenant un noyau aromatique sont quantitativement retenus sur le charbon et retrouvés dans l'éluat ; 2° - Cette rétention est spécifique quelle que soit dans les dipeptides la position ou la nature de l'acide aminé aromatique ; les acides aminés neutres aliphatiques et les peptides aliphatiques ne sont pas retenus sur charbon dans les conditions de nos chromatographies.

^{°)} L'élution par l'eau saturée d'acétate d'éthyle a déjà été utilisée, par Wachtel et Cassidy (120) dans le cas de quelques acides aminés neutres adsorbés par Darco 660, et par Tiselius (107). D'autre part, Schramm et Primosigh (87) ont proposé d'éluer les acides aminés aromatiques par une solution de phénol à 5 % dans une solution aqueuse, d'acide acétique à 20 % : ils ont effectivement récupéré l'azote total correspondant aux acides aromatiques mis en jeu, toutefois nous avons constaté que dans ces conditions le tryptophane est totalement détruit et la tyrosine et la phénylalanine le sont partiellement. De telles pertes ont été constatées également par Tiselius, Drake et Hagdahl (109) avec ce mode d'élution.

TABLEAU VII

Adsorption sur Charbon

Les quantités des substances étudiées sont comprises entre 5 et 20 mg.

N = Azote d'après Kjeldahl.

Sp = *Dosages spécifiques* : Phénylalanine et Alanylphénylalanine d'après Kapeller-Adler (59), Tyrosine et peptides à tyrosine d'après Folin et Marenzi (39). Tryptophane d'après Bates (4).

Par spectrographie : Ac. p-aminobenzoïque ; ac. p-amino-benzoylaspartique ($\lambda = 2.500$) ; cysteïl-tyrosine, cystyl-tyrosine, ($\lambda = 2.750$) ; glycyl-tryptophane ($\lambda = 2.780$).

N° des essais	Substances non adsorbées	% dans le filtrat N	Substances adsorbées	% dans l'éluat	
				N	Sp
1	—	0	Phénylalanine 8,09 mg	100	—
2	—	0	Tyrosine 13,10 mg	100	98
3	Glycyl-glycyl-glycine	100	Tryptophane	0	—
4	—	0	Glycyl-tryptophane	101	94
5	—	1,7	Tyrosyl-cystéine	98	—
6	—	0	Cysteïl-tyrosine	101	101
7	—	0	Cystyl-tyrosine	100	103
8	—	0	Ac.p-aminobenzoïque	100	100
9	—	2	Ac.p-aminobenzoyl-glutam.	98	102

A. — Solutions ne contenant que des substances appartenant à un même groupe.

B. — Solutions contenant des substances appartenant à des groupes différents.

10	Partie neutre d'un hydrolysatsynthétique de 100 mg d'insuline	94	Partie aromatique d'un hydrolysatsynthétique de 100 mg d'insuline	102	—
11	Leucyl-glycine	101	Leucyl-tyrosine	97	100
12	Glycyl-leucine	98	Glycyl-tyrosine	100	100
13	Alanyl-glycine	100	Alanyl-phénylalanine	100	99

*) Correspondant à la partie aromatique de 100 mg d'insuline.

IV. - Séparations chromatiques d'acides aminés et de peptides neutres en présence de formol.

Principe - Il est connu que le formol agit sur les acides aminés, en bloquant la fonction amine dont l'action ionique sur la fonction acide se trouve ainsi supprimée. Cette sorte d'« acidification » est si importante qu'elle permet la titration de la fonction carboxylique par la soude en présence de phénolphthaléine comme indicateur (méthode de Sørensen). Le formol agit donc en déplaçant la constante de dissociation acide apparente $pK'a$ d'acides aminés dans le domaine acide.

Examinons le tableau suivant de Dunn et Loshakoff (33) indiquant les $pK'a$ d'acides aminés et de peptides dans l'eau et dans le formol :

TABLEAU VIII

*Constantes de dissociation acide apparente
d'acides aminés et de peptides neutres dans l'eau
et dans le formol à 9 % (d'après Dunn et Loshakoff (33))*

Acide aminé	$pK'a$		Δ	Peptides	$pK'a$		Δ
	Eau	Formol à 9 %			Eau	Formol à 9 %	
dl-alanine	9.68	6.96	2.72	dl-alanyl-glycine	8.18 *)	5.52	2.66
dl-valine	9.64	7.47	2.17	dl-leucyl-glycine	8.18 *)	5.57	2.61
dl-norleucine	9.77	7.10	2.67	dl-leucyl-l-tyrosine	—	5.07	—
dl-phénylalanine	9.12	6.80	2.32				
Glycocolle	9.60	5.92	3.68	Glycyl-glycine	8.13	4.27	3.85
dl-sérine	9.15	5.63	3.52	Glycyl-glycyl-glycine	8.00	4.24	3.76
				Glycyl-dl-leucine	8.29 *)	4.40	3.89

*) D'après French et Edsall (43).

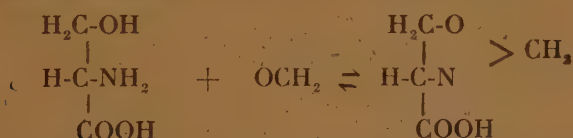
On voit que le déplacement des $pK'a$ dans le formol par rapport à l'eau (Δ) n'est pas du même degré pour toutes ces substances. Pour les acides aminés, on peut distinguer deux cas : 1° : L'alanine, la valine, les leuciles, la phényl-

alanine, etc., dont le $pK'a$ est déplacé en moyenne de 9,5 dans l'eau, à 7,0 dans le formol à 9 %. 2° : Le glycocole, la sérine, qui subissent une acidification plus forte (déplacement du $pK'a$ de 9,60 à 5,92 pour le glycocole, et de 9,15 à 5,63 pour la sérine).

Schramm et Primosigh (87, 88) ont utilisé ce phénomène pour séparer : glycocole, sérine, thréonine et cystéine des autres acides aminés neutres par adsorption en présence de formol à 10 % sur « alumine acide » préparée d'après Wieland (122) (v. p. 10). Seuls les quatre acides aminés mentionnés plus haut sont suffisamment acides pour être adsorbés au même titre que les acides dicarboxyliques, tandis que les autres acides aminés neutres passent à travers la colonne.

D'après Schramm et Primosigh, la position singulière du glycocole s'expliquerait par le fait que son groupe aminé étant lié à un carbone primaire, le formol ne trouverait aucun empêchement stérique pour s'approcher de la molécule, comme dans le cas d'autres acides aminés. Cette hypothèse semblait être vérifiée par le fait que la β -alanine est également adsorbée dans ces conditions en présence du formol (62). Nous avons cependant vérifié que l'acide Σ -aminocaproïque ne se comporte pas de la même façon et qu'il n'est adsorbé que partiellement (50 %) sur alumine acide dans le formol à 10 %. Cela semble indiquer que l'hypothèse du carbone primaire serait à écarter.

Dans le cas de la sérine et de la thréonine, il y a à envisager la formation d'un noyau d'oxazolidine, le formol réagissant en même temps que le NH_2 et l' OH :



La cystéine donne d'une manière analogue l'acide thiazolcarboxylique. Le formol est ainsi, dans ces cas, plus fortement fixé sur le groupe aminé que dans les autres acides aminés neutres, où le complexe acide aminé-formol est fortement dissocié.

Le tableau de Dunn et Loshakoff montre aussi que les peptides neutres sont, dans le formol à 9 %, nettement plus acides que les acides aminés ($pK'a$ entre 5,57 et 4,24). Lederer et Tchen Pau Kiun (62) ont utilisé ce phénomène, pour indiquer une méthode de séparation des peptides neu-

tres et des acides aminés. Les peptides neutres sont, tout comme le glyocolle, la sérine et la thréonine, fixés sur la colonne d'alumine acide, tandis que les autres acides aminés passent à travers sans être adsorbés. L'élution des substances adsorbées peut se faire à l'alcali d'après Schramm et Primosigh (87) ; nous avons trouvé que le lavage de la colonne à l'eau chaude suffit pour dissocier le complexe formolé des peptides ; ils sont ainsi élués et on les obtient exempts de sels.

Le tableau VIII montre finalement que le déplacement de pK_a par l'addition de formol à une solution de peptides est du même degré que celui observé pour l'acide aminé présent dans le peptide avec son groupe aminé libre. C'est ainsi que Δ est de 2,6 environ pour la leucine et l'alanine, ainsi que pour l'alanyl-glycine tandis que Δ est de 3,6 pour la glycine et pour tous les glycy-peptides. Nous avons utilisé cette différence d'acidité entre les glycy-peptides, séryl-peptides et les autres peptides neutres pour leur séparation quantitative dans le formol à 1 %.

1. - ADSORPTION DE PEPTIDES NEUTRES SUR ALUMINE ACIDE EN PRESENCE DE FORMOL à 10 %

Lederer et Tchen Pau Kiun (62) ont étudié l'adsorption des substances seules et en avaient déduit la possibilité de séparer l'ensemble peptides + glyocolle + sérine + thréonine + cystéine des autres acides aminés neutres. En reprenant ce travail, nous l'avons achevé en fixant les conditions exactes d'adsorption chromatographique et d'élution, et en faisant plusieurs séparations de mélanges.

A - Préparation des réactifs.

a) *Alumine acide* : N'ayant pas à faire d'élution par l'acide chlorhydrique à chaud, mais simplement par l'eau chaude, nous utilisons au début de ce travail l'alumine Merck et ensuite l'alumine pour chromatographie Prolabo, préparées d'après Wieland (122) (traitement par HCl N et quelques lavages à l'eau). Mais l'alumine Prolabo ne nous a pas donné tout d'abord de résultats satisfaisants pour l'adsorption dans le formol à 10 %. Il a fallu la laver avec de l'eau dans la colonne, pour éliminer l'excès d'acidité. Par la suite, nous avons utilisé l'alumine proposée par nous pour la chromatographie des acides dicarboxyliques (v. p. 27) qu'il est plus facile d'ajuster au pH voulu par lavage

avec une petite quantité d'eau (50 à 100 ml pour 10 gr d'alumine).

b) *Formol* : On utilise une solution de formol commercial (40 % environ) redistillé à pression ordinaire et ajusté au titre voulu. Pour l'adsorption dans le formol à 10 %, on neutralise la solution au dernier moment, en présence de phénolphthaléine, par la soude N/10 jusqu'à coloration rose pâle (pH voisin de 8.5).

B - Adsorption des peptides neutres.

Nous utilisons une colonne de 10 mm de diamètre et de 25 cm de hauteur remplie de 10 gr d'alumine acide (alumine Merck ou Prolabo, ou Aluminum Ore Company, (U. S.A.). Le pH de la colonne doit être rigoureusement contrôlé, car les séparations de peptides et d'acides aminés ne sont quantitatives que si le pH du liquide sortant de la colonne est de 4,8 à 5.0 ; à un pH inférieur, certains peptides ou la thréonine par exemple, ne sont pas retenus quantitativement (voir Tableau X). Le contrôle du pH est d'autant plus important que différentes aluminas peuvent avoir, après activation, un pH différent. On atteint le pH voulu par lavage de la colonne avec de l'eau. Nous versons ensuite sur la colonne une solution de 10 mg du mélange à séparer dans 5 ml de formol à 10 % et lavons avec 50 ml de formol à 10 %. Le filtrat ainsi obtenu contient les acides aminés neutres à l'exception de glycocolle, sérine, thréonine et cystéine ; l'élution des substances adsorbées se fait par lavage de la colonne avec 100 ml d'eau chaude (90-100°)*).

Quelquefois cette élution n'est pas quantitative : dans le cas du glycyl-tryptophane, par exemple, on élue seulement 80 % environ ; le reste de la substance, consistant probablement en un produit cyclisé (dérivé de la tétrahydrocarboline, peut être élué à l'alcali.

Nous dosons l'azote d'après Kjeldahl dans le filtrat et dans l'éluat. Dans plusieurs essais, nous avons en outre vérifié l'efficacité des séparations par un dosage spécifique de l'une ou de l'autre des substances séparées. Le tableau IX montre quelques résultats.

*) La cystéine est irréversiblement cyclisée en acide thiazolcarbonique et ne peut être élue que par l'alcali.

TABLEAU IX

Séparation de mélanges binaires d'acides aminés et de peptides dans le formol à 10 %.

N = Dosage d'azote d'après Kjeldahl.

Sp = Dosages spécifiques : (a) Dosage de phénylalanine d'après Kapeller-Adler (59) ; (b) Dosages d'alanine et de leucine à la ninhydrine d'après Van Slyke (116) dans l'appareil de West, Christensen et Rinehart (121) ; (c) Dosage de tyrosine d'après Folin et Marenzi (39),

N°	Substances non adsorbées	mg N		%		mg N		%	
		dans la prise	trouvé dans le filtrat	N	Sp	dans la prise	trouvé dans l'éluat	N	Sp
1	Alanine	0.816	0.811	99.4		0.551	0.559	101.3	
2	Alanine	0.705	0.698	99		0.300	0.302	100.5	
3	Alanine	0.905	0.908	100	94.6 (b)	0.660	0.655	99.2	100 (a)
4	Leucine	0.742	0.742	100	101.6 (b)	0.588	0.580	99	
5	Leucine	0.589	0.593	100.7		0.336	0.340	101.2	
6	Tyrosine	0.374	0.374	99.2	98 (c)	0.892	0.905	101.5	
7	Tryptophane	0.663	0.648	98	*)	0.837	0.842	100.5	

*) Le tryptophane est sans doute transformé en carboline, car on n'obtient aucune coloration, ni à la ninhydrine, ni avec le réactif de Fürth et Dische (46).

On voit que les séparations sont pratiquement quantitatives. Nos expériences s'étendent actuellement aux peptides suivants : 9 dipeptides (glycyl-glycine, glycyl-leucine, glycyl-tyrosine, glycyl-tryptophane, alanyl-glycine, alanyl-leucine, alanyl-phénylalanine, leucyl-glycine et leucyl-tyrosine) et 2 tripeptides (glycyl-glycyl-glycine et leucyl-glycyl-glycine) ; ils se comportent tous de la même façon.

Le filtrat de la colonne d'alumine contient du formol à 10 %, ce qui gêne la plupart des dosages spécifiques ; on s'en débarrasse par plusieurs distillations à pression ordinaire (mais non sous vide), en milieu légèrement acide.

Quand il s'agit de la plupart des peptides et des acides aminés, il est assez facile de chasser le formol de cette façon. Il existe néanmoins des acides aminés, comme la cystine et le tryptophane, qui réagissent irréversiblement avec le formol (43) ; ceci s'applique aussi aux peptides qui contiennent ces acides aminés. Dans ces cas, il n'est évidemment pas question d'effectuer les dosages spécifiques de ces composés et il faut se contenter du seul chiffre obtenu par le dosage d'azote. C'est d'ailleurs cet inconvénient qui nous a empêché de continuer la séparation des acides aminés neutres dans un hydrolysât total d'insuline, par l'adsorption du glycolle, de la sérine, de la thréonine et de la cystéine en présence du formol à 10 %. L'inconvénient est moins grave quand il s'agit de l'adsorption des peptides dont la plupart donnent avec le formol des complexes facilement dissociables.

C. - Influence du pH sur la chromatographie dans le formol à 10 %.

Les deux essais suivants montrent l'influence du pH de la colonne sur la marche de l'adsorption. Nous avons chromatographié deux fois 5 mg de thréonine, dissous dans 5 ml de formol à 10 % (pH 8,5), sur des colonnes de 10 g d'alumine acide. La première colonne a été préalablement lavée avec 50 ml de formol à 10 %. Le pH des dernières gouttes de lavage sortant de cette colonne, mesuré à l'électrode de verre était de 4.0. La deuxième colonne a été d'abord lavée avec 300 ml d'eau distillée et ensuite avec 50 ml de formol à 10 %. Le pH est ainsi amené à 4,9.

TABEAU X

Influence du pH sur l'adsorption de 5 mg de thréonine sur 10 g. d'alumine acide dans le formol à 10 %.

Lavage de la colonne avec :		Colonnes			
		I : pH 4.0		II : pH 4.9	
		mg N	%	mg N	%
1	5 ml. de la solution de thréonine +				
	20 ml de formol à 10 %	0,024	4,0	0,011	1,6
2	25 ml de formol à 10 %	0,014	1,8	0	0
3	« « «	0,032	5,3	0	0
4	« « «	0,108	18,0	0,004	0,7
5'	100 ml d'eau chaude	0,432	72,0	0,579	96 0
TOTAL		0,607	101,1	0,594	98,5

On voit que la thréonine n'est que partiellement fixée sur la colonne à pH 4,0, tandis qu'elle est quantitativement retenue par la deuxième colonne à pH 4.9. Les 1,8 % d'azote passant dans le premier filtrat sont certainement dûs à des impuretés.

2. - ADSORPTION DE GLYCYL-, SERYL- ET CYSTEYL-PEPTIDES SUR ALUMINE ACIDE EN PRESENCE DE FORMOL A 1 %.

Le déplacement du pK'a des peptides et acides aminés en présence de formol se fait en fonction de la concentration de ce dernier. Treadwell et Bergsland (111) ont étudié le comportement de quelques acides aminés en présence de formol de concentrations variables (fig. 1).

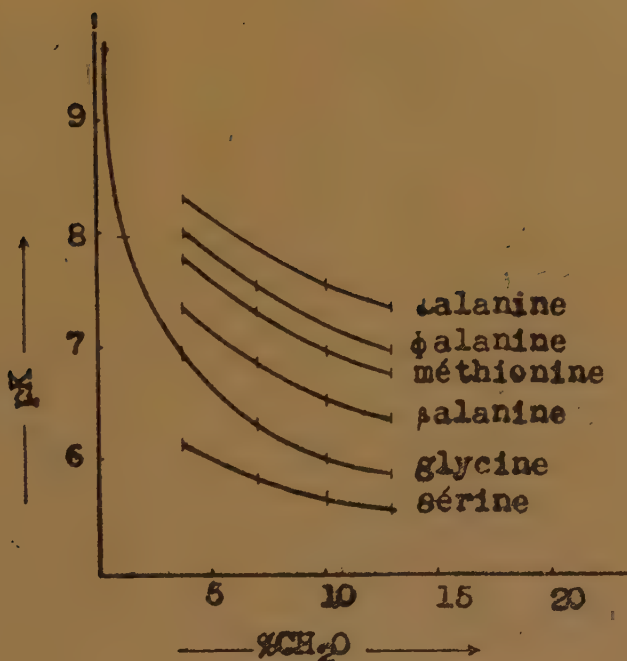


Fig. 4 : Déplacement du pK'a des acides aminés en fonction de la concentration en formol (111).

Il résulte de cette courbe qu'un passage d'une concentration de 10 % de formol à celle de 5 % se manifeste en général par une augmentation du pK'a des acides aminés correspondants de une unité. Certains d'entre eux cependant, dont le pK'a est suffisamment bas dans le formol à 10 % (sérine, glycine) sont encore acides malgré l'abaissement de la concentration du formol de 10 à 5 %. Les autres acides aminés ont par contre leur pK'a dans le formol à 5 % très voisin de 8 (β-alanine, méthionine). Nous avons donc cherché la concentration en formol à laquelle le déplacement du pK'a vers le domaine acide des glycy-peptides serait suffisant pour permettre leur adsorption sur une colonne d'alumine acide, tandis que les autres peptides passeraient sans être retenus.

Des essais avec les solutions de formol à 0,5 %, 1 % et 2 % nous ont amenés à adopter le formol à 1 % pour ces séparations. Dans ces conditions, et en utilisant une colonne appropriée d'alumine acide, seuls les glycy-, séryl- et cystéyl-peptides sont adsorbés, tandis que les alanyl- et

leucyl-peptides ainsi que le glyocolle, la sérine, la thréonine et la β -alanine passent dans le filtrat. N'ayant pas tout d'abord à notre disposition toutes ces catégories de peptides, nous étions obligés de nous contenter de la seule hypothèse, que les séryl-, thréonyl- et cystéyl-peptides se comportent de la même façon que les glycy-peptides. Par la suite, nous avons vérifié que les cystéyl- et séryl-peptides sont effectivement adsorbés dans le formol à 1 % dans les mêmes conditions que les glycy-peptides. Il est à prévoir que les thréonyl-peptides vont suivre le même chemin. Par contre, nous avons pu vérifier que les β -alanyl-peptides ne sont pas retenus dans le formol à 1 %, ce qui prouve une fois de plus que l'hypothèse du carbone primaire (v. p. 35) serait à rejeter. Par contre, en étudiant les diagrammes de Treadwell et Bergsland (fig. 1) on remarque que la courbe correspondant à la β -alanine se trouve nettement au-dessus de celle du glyocolle, en conséquence un abaissement de la concentration en formol, agissant dans le sens d'une augmentation du $pK'a$, ferait que la β -alanine se trouverait plus rapidement dans la zone du $pK'a$ alcalin que le glyocolle. Si les glycy- et les β -alanyl-peptides se comportent de façon analogue aux acides aminés qui les composent, ce serait là une explication satisfaisante de la non adsorbabilité des β -alanyl-peptides dans le formol à 1 %.

A - Adsorbant.

On utilise pour ce genre de chromatographie l'alumine « Prolabo » préparée selon Wieland (122). Le pH-optimum de la colonne n'est pas 4,9, comme pour les essais dans le formol à 10 % mais 3,7 à 3,9. L'alumine préparée selon notre méthode (v. p. 27) pour l'adsorption des acides aminés dicarboxyliques ne convient pas pour ces adsorptions. Nous insistons sur le fait que le pH de la colonne doit être rigoureusement vérifié si l'on veut avoir des adsorptions quantitatives.

B - Adsorption des glycy-, séryl- et cystéyl-peptides.

La prise, contenant environ 5 mg d'un de ces peptides, et autant d'autres peptides neutres, non adsorbés, est dissoute dans 5 ml de formol à 1 % et versée sur une colonne de 5 g d'alumine acide, lavée préalablement avec 50 ml de formol à 1 % (pH 3,7-3,9). On lave ensuite avec 45 ml de formol à 1 %. Le filtrat ainsi obtenu contient les peptides non adsorbés. L'élution des peptides adsorbés, se fait avec 100 ml d'eau chaude (80-90°) pour les glycy-

et séryl-peptides et avec 30 ml d'acide chlorhydrique N pour les cystéyl-peptides. L'élution du glycyl-tryptophane n'étant pas complète avec de l'eau chaude, nous l'avons complétée avec 10 ml de KOH N/2 suivis de 20 ml de KOH N/10.

Le tableau XI montre des séparations accomplies dans le formol à 1 %.

On voit d'abord (essais 2 à 7) que les β -alanyl- deux leucyl, deux alanyl-dipeptides et un leucyl-tripeptide ne sont pas retenus par la colonne ; le glycocolle, la sérine (essais 20, 21, la thréonine (tableau X) et la β -alanine (essai 1) passent également dans le filtrat. La tyrosyl-cystéine (essai 8) qui dans ces conditions ne devrait pas être adsorbée, subit une rétention de 25 % sur la colonne. Cette adsorption anormale peut être attribuée soit à l'insolubilité du dipeptide au pH de l'adsorption, soit à une impureté présente dans le produit.

Les essais 9 à 15 montrent que les glycyl- séryl- et cystéyl- dipeptides et un glycyl-tripeptide sont quantitativement retenus par la colonne ; l'élution par l'eau chaude pour les glycyl- et séryl-peptides et par HCl N pour les cystéyl-peptides est quantitative, sauf pour le glycyl-tryptophane dont 6 % environ (transformés en carboline) sont plus fortement retenus. On peut les éluer à l'alcali dilué.

Les essais 16 à 19 montrent des séparations de mélanges de deux peptides. Dans les essais 16, 17 et 21, nous avons confirmé la spécificité de la séparation par des dosages spécifiques du peptide élué. Les essais 1, 20 et 21 montrent que le glycocolle, la sérine et la β -alanine, qui, dans le formol à 10 % se fixent sur l'alumine, ne sont plus adsorbés en présence de formol à 1 %. On les sépare ainsi des glycyl-peptides qui restent sur la colonne. Là aussi des dosages spécifiques ont vérifié et confirmé les résultats des dosages d'azote. La β -alanyl-leucine, malgré son radical β -alanyl, n'est pas retenue dans le formol à 1 %.

Les faibles quantités d'azote restées sur la colonne, dans les essais 1 à 7 ou passées dans le filtrat, dans les essais 9 à 15 (moins de 3 %) sont certainement dues à des impuretés des peptides employés. Les 25 % d'azote retenus dans le cas de la tyrosyl-cystéine (essai 8) peuvent être en plus dûs à l'insolubilité du peptide au pH de la chromatographie (3,7-3,9).

Des essais ultérieurs montreront si les tétra-, penta-, hexapeptides neutres se laissent encore séparer en deux

TABEAU XI.

Adsorption spécifique de glycyl-, séryl- et cystéyl-peptides sur alumine acide dans le formol à 1 %
N = Azote d'après Kjeldahl exprimé en azote % de l'azote de la solution initiale.
Sp = Dosages spécifiques : (a) glyco-colle après hydrolyse d'après Alexander, Landwehr et Seligman (3)
- (b) tryptophane dans le glycyl-tryptophane élué, d'après Fürth et Dische (46) ; (c) tyrosine dans la glycyl-tyrosine éluée, d'après Folin et Marenzi (39).

N°	Substances non adsorbées	Mg N		%		Substances adsorbées	mg N		%
		dans la prise	trouvé dans le filtrat	N	Sp		dans la prise	trouvé dans l'état	
A. — Solutions ne contenant que des substances appartenant à un même groupe :									
1	β -alanine	0.755	0.744	98.5					
2	β -alanyl-dl-leucine	0.703	0.707	100					
3	Alanyl-leucine	4.165	4.170	100					
4	Alanyl-phénylalanine	0.820	0.790	97					
5	Leucyl-glycine	0.690	0.680	98.5					
6	Leucyl-tyrosine	0.422	0.416	98.7					
7	Leucyl-glycyl-glycine	1.802	1.755	97.3					
8	Tyrosyl-cystéine	0.513	0.385	75					
9	—	—	—	—		Glycyl-glycine	1.035	1.035	100
10	—	—	—	—		Glycyl-leucine	0.757	0.737	98.3
11	—	—	—	—		Glycyl-tyrosine	4.320	4.260	97
12	—	—	—	—		Glycyl-tryptophane	4.590	4.580	99.5
13	—	—	—	—		Glycyl-glycyl-glycine	2.200	2.110	96
14	—	—	—	—		Séril-glycine	0.843	0.820	97.3
15	—	—	—	—		Cystéyl-tyrosine	0.487	0.476	97.8
B. — Solutions contenant des substances appartenant à des groupes différents :									
16	Alanyl-leucine	0.292	0.298	102		Glycyl-leucine	0.753	0.740	98.3
17	Alanyl-leucine	0.670	0.670	100		Glycyl-tryptophane	0.815	0.800	98
18	Leucyl-glycine	0.692	0.692	100.7		Glycyl-leucine	0.588	0.580	98.6
19	Leucyl-glycine	0.646	0.647	100		Glycyl-tryptophane	0.815	0.819	100.5
20	Glycocolle	0.792	0.788	99.6	103(a)	Glycyl-glycine	1.055	1.071	101.3
21	Sérine	0.543	0.530	97.6		Glycyl-tyrosine	0.570	0.570	100

groupes suivant la méthode indiquée ; il se peut évidemment que les peptides devant passer dans le filtrat soient retenus sur la colonne, par suite de leur poids moléculaire très élevé. Mais même si la spécificité de la méthode élaborée diminue pour des peptides plus lourds, elle conserve une certaine valeur, puisque l'on peut conduire l'hydrolyse partielle des protéines de façon à obtenir surtout des di- et tripeptides.

TROISIÈME PARTIE

Application à l'insuline - Avec une note sur le dosage de la proline.

Il était indispensable de vérifier la validité des techniques précédentes de séparation en les appliquant à une protéine connue. Nous avons choisi l'insuline de bœuf. Cette protéine présente en effet l'avantage de pouvoir être obtenue cristallisée, sous un état que l'on peut considérer comme pur, et dont l'activité biologique constitue une preuve satisfaisante. D'autre part, l'insuline a fait l'objet de nombreuses investigations concernant sa composition en acides aminés. Chibnall (19), Tristram (28, 112) et Brand (12), en particulier, ont réuni en des tableaux les chiffres obtenus à ce point de vue par eux-mêmes et par d'autres auteurs, chiffres qui sont actuellement les meilleurs. Ce sont eux que nous utilisons ici comme base de comparaison.

Nos investigations ont porté d'une part sur un mélange, en présence de chlorure de lithium, de la totalité des acides aminés correspondant à un hydrolysât total d'insuline (« hydrolysât synthétique » du tableau XII) ; d'autre part, sur l'hydrolysât chlorhydrique total d'un échantillon d'insuline de bœuf, parfaitement cristallisé, titrant 27 U.I./mg, provenant de la maison « Organon » et qui représente de l'insuline pure (64) ; d'autre part enfin, sur l'hydrolysât chlorhydrique total d'un échantillon d'insuline commerciale, cristallisée, titrant 22 U.I./mg et qu'il nous a paru intéressant de comparer, en ce qui concerne sa composition en acides aminés, au produit pur.

A titre d'exemple, nous décrivons tout d'abord le mode opératoire suivi dans le fractionnement par chromatographie d'un hydrolysats total d'insuline en 4 groupes, et ensuite l'analyse des acides aminés dans les groupes : neutre aromatique et neutre non aromatique, par la chromatographie quantitative sur papier d'après Fischer, Parsons et Morrison (37) et Brimley (13) ; enfin, nous indiquons, basé sur la chromatographie quantitative sur papier, un procédé de dosage spécifique de la proline, mis au point par nous.

I. — PARTIE EXPERIMENTALE

1. — Préparation de l'hydrolysats

110 mg d'insuline de bœuf finement pluvérisée et séchée sous vide (0,7 mm Hg, 80°, 12 h.) sont hydrolysés par environ 4 ml d'acide chlorhydrique 5,5 N, en tube scellé, sous vide, à 110°, pendant 24 heures. L'hydrolysats est ensuite amené exactement à 55 ml. On prélève 5 ml pour le dosage de l'azote total d'après Kjeldahl. Les 50 ml restant sont évaporés 3 fois à sec, après additions successives d'eau distillée, dans un dessiccateur, sous vide, à la température ordinaire, en présence de chaux sodée et de chlorure de calcium anhydre. L'acide chlorhydrique subsistant est neutralisé et le milieu légèrement alcalinisé (coloration franchement rose avec la phénolphthaléine). par 16,7 ml de lithine 0,1 N, ce qui correspond à la formation dans le milieu, de 71 mg de chlorure de lithium. On dose alors l'ammoniac sur l'ensemble en l'entraînant par la vapeur d'eau, sous vide, à 45°.

2. — Fractionnement de l'hydrolysats par chromatographie en 4 groupes d'acides aminés.

a) *Chromatographie sur gel de silice.* - (v. p. 19.). La solution, débarrassée de l'ammoniaque, est ramenée à pH 7 par quelques gouttes d'acide chlorhydrique 0,1 N. On la fait passer (37-40 ml) sur une colonne de 35 g. de gel de silice ; on obtient un filtrat (I) et un éluat. On dose dans ce dernier l'azote total, l'arginine et l'histidine d'après Sakaguchi et Pauly respectivement, selon les procédés de McPherson (67) ; la lysine est calculée par différence. D'au-

tre part, une partie de l'éluat est concentrée sous vide et soumise à la chromatographie qualitative de partage, selon Consden, Gordon et Martin, en utilisant comme solvant le phénol additionné de 0,1 % d'ammoniaque. On obtient ainsi les 3 taches correspondant aux 3 bases hexoniques, et uniquement ces taches, ce qui confirme la spécificité de la séparation.

b) *Chromatographie sur alumine acide* (v. p. 27). - Le filtrat (I) provenant de l'opération précédente est concentré sous vide jusqu'à 5 ml environ, saturé par l'hydrogène sulfuré et neutralisé. On fait passer la solution obtenue (5-6 ml) sur une colonne d'alumine acide, ce qui fournit un filtrat (II) et un éluat. On dose dans ce dernier l'azote total, l'acide aspartique d'après Fromageot et Colas (45), l'acide glutamique étant calculé par différence. Une partie de l'éluat est d'autre part concentrée sous vide et soumise à la chromatographie de partage sur papier, en utilisant comme précédemment le phénol additionné de 0,1 % d'ammoniaque. On obtient ainsi les deux taches correspondant respectivement aux acides glutamique et aspartique, et ces deux taches seulement ; là encore, la séparation se montre spécifique.

c) *Chromatographie sur charbon* (v. p. 30). - Le filtrat (II) provenant de la chromatographie sur alumine acide est évaporé à sec sous vide, et le résidu est dissous dans 10 ml d'une solution d'acide acétique à 5 % saturée d'hydrogène sulfuré. Le passage sur une colonne de 0,5 g. de charbon donne un filtrat (III) et un éluat. On dose dans l'éluat l'azote total et les acides aminés aromatiques : la phénylalanine d'après Fisher et Coll. (37) ; la tyrosine d'après Folin et Marenzi (39). Dans le filtrat (III), on dose l'azote total ; le glyco-colle d'après Alexander, Landwehr et Seligman (3) et d'après Fisher et Coll. ; l'alanine et la sérine d'après Fisher et Coll. ; la valine, la leucine et l'isoleucine d'après Schweigert, McIntyre, Elvehjem et Strong (92) à l'aide de *Lactobacillus arabinosus*, et pour la valine, d'après Fisher et Coll. ; la proline d'après la méthode indiquée ci-dessous. La cystine est déterminée, sur un hydrolysats spécial, d'après Folin et Marenzi (40).

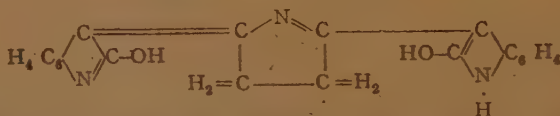
En plus, on vérifie dans le filtrat (III) et dans l'éluat, par la chromatographie de partage sur papier, qu'ils ne contiennent que des acides aminés correspondant aux groupes respectifs.

3° — Méthode analytique quantitative sur papier

Nous avons employé ici le procédé de Fisher, Parsons et Morrison (37) basé sur le fait que les surfaces des taches obtenues par chromatographie de partage sur papier des acides aminés sont proportionnelles au logarithme de leurs concentrations respectives. Nous établissons d'abord une échelle de référence, telle que les concentrations de chacun des acides aminés dosés soient échelonnées entre 300 et 1.500 μ g/ml. Nous plaçons ensuite au sommet d'une feuille de papier (Whatman n° 1) et dans des conditions identiques des volumes rigoureusement égaux (entre 3 et 5 μ l) des solutions de référence et de diverses dilutions de la solution à doser de telle façon que les concentrations des acides aminés à doser soient comprises entre 300 et 1.500 μ g par ml. Le développement (v. p. 15) est fait au moyen de phénol dans le cas du glycocolle, de l'alanine, de la sérine et de la thréonine, et de butanol dans le cas de la valine, de la leucine, de l'isoleucine et de la phénylalanine. Chacun des solvants contient 0,1 % de cupron ou 0,1 % d'ammoniac. La révélation est effectuée par la ninhydrine en solution à 0,2 % dans le butanol. La mesure des surfaces des taches se fait, après les avoir entourées en lumière jaune, au crayon, à l'aide d'un planimètre.

II. — DOSAGE DE LA PROLINE

La proline était jusqu'ici assez difficile à doser de façon spécifique ; aucune méthode chimique n'était capable de s'appliquer à des quantités de l'ordre de quelques microgrammes. Le procédé que nous utilisons ici consiste en une chromatographie quantitative sur papier, au cours de laquelle la proline est révélée par l'isatine et non par la ninhydrine. Grassmann et von Arnin (53) ont montré que l'isatine donne avec la proline une coloration bleue, due à la formation du composé :



Ils avaient déjà constaté la fixation de la matière colorante sur des fibres d'acétate de cellulose, et utilisé ce phénomène pour la microcaractérisation de la proline. Ici, la

proline ayant été séparée par chromatographie sur papier, la réaction est exécutée sur le papier, et la concentration en proline est déterminée d'après la surface des taches formées, surface qui est, selon Fisher et Coll, proportionnelle au logarithme de la concentration en l'acide aminé.

Mode opératoire — Soit à doser la proline dans un hydrolysate de protéine obtenu par action de l'acide chlorhydrique. L'hydrolysate ayant été soumis aux séparations indiquées précédemment, la proline se trouve dans le filtrat final, avec l'ensemble des acides monoaminés monocarboxyliques non aromatiques. On concentre cette dernière fraction et, par dilution convenable, on prépare une solution telle que la concentration en proline soit comprise entre 300 et 1.500 μ g/ml. On dispose d'autre part d'une série de solutions de proline pure, de concentrations échelonnées entre 300 et 1.500 μ g/ml et qui servent à établir une échelle de référence. De chacune de ces solutions, on prélève des volumes rigoureusement égaux, compris entre 3 et 5 μ l, qu'on dépose à la partie supérieure de la feuille de papier utilisée pour la chromatographie (papier Whatman n° 1). On opère ensuite de la façon habituelle, en développant par du butanol normal, additionné de 10 % d'éthanol absolu, le mélange étant saturé d'eau. Le R_f de la proline est alors 0,20 et la séparation de la proline des autres acides aminés neutres non aromatiques est très bonne. L'isatine est utilisée en solution à 0,2 % dans du butanol normal contenant 4 % d'acide acétique pur. Dans ces conditions, la proline donne des taches d'un bleu intense, régulières, se détachant nettement sur un fond légèrement jaune, et particulièrement commodes pour des déterminations quantitatives ; on abandonne 24 heures à l'obscurité. On mesure les surfaces au planimètre. On opère ensuite comme dans le cas général : utilisant les valeurs trouvées à l'aide des solutions étalons, on trace la droite représentant les surfaces en fonction des logarithmes des concentrations ; le report sur cette droite des valeurs trouvées pour les surfaces des taches fournies par les solutions à doser permet de déterminer les quantités de proline contenues dans chacune de ces solutions.

Remarques. - Sauf l'hydroxyproline, les autres acides aminés susceptibles d'accompagner la proline, ne donnent avec l'isatine que des taches roses, peu visibles, et qui disparaissent après quelques heures, alors que les taches bleues de la proline persistent avec toute leur intensité pendant plusieurs jours. Quant à l'hydroxyproline, elle fournit des taches qui, à concentrations égales, représen-

tent une coloration beaucoup plus faible que celle de la proline ; cette faiblesse de coloration empêche l'emploi de la même méthode pour le dosage spécifique de l'hydroxyproline. Les taches données par cette dernière ne gênent d'ailleurs nullement le dosage de la proline, car sur le papier elles se placent bien au-dessus de cet acide aminé.

La coloration bleue n'est stable que si elle est fixée sur un support solide, papier (cellulose) ou acétate de cellulose ; malgré de nombreuses tentatives, nous ne sommes pas arrivés à établir de conditions telles que la coloration résultant de la réaction entre isatine et proline soit suffisamment stable en solution pour permettre des mesures spectrophotométriques précises.

III. — RESULTATS

Nous donnons tout d'abord dans le tableau XII le résultat de la séparation chromatographique en quatre groupes des acides aminés opérée, d'une part sur un « hydrolysats synthétique » constitué d'après Tristram (112, 28) et d'autre part sur un échantillon d'insuline de bœuf, cristallisée, à 27 U.I./mg et un autre à 22 U.I./mg.

Les chiffres du tableau XII montrent que : 1° - Il existe un excellent accord entre les valeurs trouvées par la présente méthode pour l'azote total du groupe basique, l'azote total du groupe acide et l'azote total du groupe aromatique correspondant d'une part aux valeurs données par Tristram et d'autre part à l'« hydrolysats synthétique » et à l'hydrolysats total d'insuline à 27 U.I./mg. 2° - Cet accord est encore satisfaisant, quoique moins bon, dans le cas du groupe neutre non aromatique (écart de 4 à 6 %). 3° - L'insuline à 22 U.I./mg se révèle différente de l'insuline pure non seulement par sa moins grande activité biologique, mais aussi par sa composition chimique.

Dans les tableaux XIII et XIV, nous donnons les résultats obtenus au cours de l'analyse totale de chacun des quatre groupes d'un hydrolysats d'insuline. A titre de comparaison, nous indiquons dans le tableau XIV les chiffres publiés précédemment, d'une part par Brand (12) et d'autre part par Chibnall (18, 19) et par Tristram (112, 28). Ces résultats montrent que : 1° - Il existe un accord général satisfaisant entre les valeurs de chaque acide aminé,

TABLEAU XII

Séparation chromatographique en 4 groupes des acides aminés d'un hydrolysât chlorhydrique total d'insuline.

A = mg d'azote correspondant à 100 mg d'insuline
chiffre trouvé

B = $\frac{\text{chiffre de Tristram}}{\text{chiffre de Tristram}} \cdot 100$

Groupe		Insuline d'après Tristram N total 15.5 %	Hydrolysât synthétique		Insuline crist. à 27 U.I./mg N total 15.3 %		Insuline crist. à 22 U.I./mg N total 15.75 %	
		A	A	B	A	B	A	B
1	Basique	2.76	2.78	101	2.78	101	3.40	123
2	Acide	2.37	2.46	104	2.42	102	3.12	132
3	Aromatique	1.70	1.73	102	1.74	102	1.46	86
4	Neutre	6.80	6.37	94	6.53	96	5.82	85.5

déterminées individuellement dans le présent travail d'une part, et dans les travaux antérieurs d'autre part. Dans l'ensemble, les écarts entre nos résultats et ceux de Chibnall et de Tristram sont suffisamment faibles pour que nous trouvions les mêmes nombres entiers de résidus d'acides aminés dans l'unité élémentaire d'insuline, de poids « moléculaire » de 12.000. 2° - Trois acides aminés font toutefois exception ; ce sont l'acide glutamique et la leucine, pour chacun desquels nous trouvons un résidu de plus, et la proline pour laquelle nous trouvons un résidu de moins.

En ce qui concerne l'acide glutamique, nous trouvons expérimentalement un nombre de résidus de 16, ce résultat étant obtenu par différence entre l'azote total de la fraction « acide » et de l'azote de l'acide aspartique ; l'accord entre cette valeur et celle de Chibnall (15,2 arrondi à 15) est, en fait, satisfaisant, et dans l'état actuel des méthodes chimiques d'analyse, il est impossible de décider entre les valeurs de 15 et 16 pour le nombre de résidus d'acide glutamique dans l'unité élémentaire d'insuline.

Pour la leucine, la valeur déterminée par nous (13,4 résidus, arrondis à 13) ne s'écarte que de 8 % de celle (12,4 résidus arrondis à 12) trouvée par Tristram ; là encore, il est difficile de décider entre ces deux valeurs ; mais com-

me au cours du dosage microbiologique de la leucine, nous avons retrouvé les mêmes résultats avec un mélange synthétique d'acides aminés correspondant à l'hydrolysât d'insuline, nous pensons que la valeur 13 pour le nombre de résidus de leucine dans l'unité élémentaire d'insuline, est la plus probable.

En ce qui concerne la proline, la différence entre notre résultat (2.2 résidus, arrondis à 2) et celui de Tristram (2.7 résidus, arrondis à 3), n'est considérable, étant donné les méthodes utilisées, que par le fait d'avoir arrondi au nombre entier le plus proche : l'écart passant ainsi de 20 à 50 %. La comparaison de la surface des taches obtenues à partir d'un hydrolysât réel d'insuline d'une part, et d'un mélange d'acides aminés de même composition, mais contenant la proportion de proline (2,56 %) indiquée par Tristram, nous a montré qu'il y a nettement moins de proline dans l'hydrolysât de la protéine. Si on écarte l'hypothèse d'une destruction d'une partie de la proline au cours de l'hydrolyse, on est conduit à admettre qu'il y a seulement 2 résidus de proline dans l'unité élémentaire d'insuline.

Quoiqu'il en soit de ces quelques différences, qui restent minimes, l'accord général qui existe entre les résultats du présent travail et ceux obtenus par les auteurs anglais dans l'analyse de la même protéine, montre la validité au point de vue quantitatif comme au point de vue qualitatif, de la méthode de séparation en groupes par chromatographie telle que nous la préconisons.

D'autre part, nous avons constaté que la méthode « quantitative » de chromatographie sur papier, préconisée par Fisher et Coll., si elle permet d'avoir une idée de l'ordre de grandeur de la concentration de certains acides aminés dans un hydrolysât de protéine, et si, à ce titre, elle rend de grands services lorsqu'aucune autre méthode n'est disponible, ne permet souvent pas d'obtenir une précision suffisante : c'est ce que nous avons vu, en particulier dans le cas de la leucine, de l'isoleucine et de la tyrosine. Pour d'autres acides aminés, comme la thréonine et la valine, les résultats sont généralement meilleurs. La proline donne des résultats satisfaisants, ce qui est dû à la spécificité de la réaction avec l'isatine, et à la netteté des taches obtenues.

TABLEAU XIII

Acides aminés de l'insuline

Chiffres exprimés en g d'acide aminé pour 100 g de protéine à 15,3 % d'azote total.

Acide aminé	Analyse par méthode autre que la chromatographie sur papier	Analyse par chromatographie sur papier	Moyenne générale
Arginine °)	2.87	—	2.87
Histidine °)	5.00	—	5.00
Lysine °)	2.72	—	2.72
Acide aspartique	5,45	—	5.45
Acide glutamique	19.3	—	19.3
Phénylalanine	—	8.2 (5) °)	8.2
Tyrosine	12.2	—	12.2
Glycocolle	4.1	4.8 (9)	4.5
Alanine	—	4.6 (7)	4.6
Sérine	—	5.2**) (9)	5.2
Cystine	12.4	—	12.4
Thréonine	2.3	2.2 (9)	2.3
Valine	7.1	7.4 (14)	7.3
Leucine	14.6	—	14.6
Isoleucine	1.6	—	1.6
Proline	—	2.0	2.0
Amide (N)	1.4	—	1.4

°) Base libre

*) Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre des dosages effectués.

**) Corrigé de + 8 % pour tenir compte de la destruction au cours de l'hydrolyse.

TABEAU XIV

Bilan des diverses formes d'azote dans l'insuline

A = Azote des acides aminés % de l'azote total de la protéine.

F = Azote des diverses fractions, calculé à partir de l'azote des acides aminés pour les résultats de Brand, de Chibnall et de Tristram, ou trouvé expérimentalement dans les fractions isolées par chromatographie pour le présent travail.

C = Azote calculé à partir du nombre des résidus (R) des acides aminés contenus dans la fraction.

Azote total des échantillons d'insuline analysés : Brand (12) 16,0 % ; Chibnall (18, 19) et Tristram (12, 112) 15,5 % ; présent travail 15,3 %

Formes d'azote	Brand		Chibnall-Tristram		Présent travail			
	F	A	F	A	F	A	R	C
Fraction basique :	19,1		17,7		18,2			18,2
Arginine		7,0		6,2		6,0	2	
Histidine		9,0		8,5		8,8	4	
Lysine		3,1		3,0		3,4	2	
Fraction acide :	16,5		15,2		15,8			16,0
Ac.aspartique		4,5		3,8		3,8	5	
Ac.glutamique		12,0		11,4		12,0	16	
Fraction aromatique :	10,1		10,4		11,4			10,6
Phénylalanine		4,2		4,4		4,6	6	
Tyrosine		5,9		6,0		6,1	8	
Fraction neutre non aromatique :	40,7		43,9		42,7			44,3
Glycocolle		5,4		5,2		5,5	7	
Alanine		—		4,4		4,7	6	
Sérine		4,8		4,5		4,5	6	
Cystine		8,0		9,4		9,5	6	
Thréonine		2,3		1,6		1,8	2	
Valine		6,6		5,8		5,8	8	
Leucine		8,9		9,3		10,2	13	
Isoleucine		1,9		1,7		1,1	2	
Proline		2,2		2,0		1,6	2	
Amide	11,0		8,9		9,2		12	9,2
TOTAL	97,4		96,1		97,3			99,3

APPENDICE

Remarques sur les résultats obtenus dans le dosage des acides aminés constitutifs d'une protéine. Application à l'insuline.

Il n'existe guère de criterium absolu de l'exactitude des chiffres fournis par le dosage des acides aminés constituant une protéine donnée. Un bon argument de la validité de ces chiffres est leur reproductibilité par des méthodes analytiques foncièrement différentes. Un argument souvent utilisé pour s'assurer que l'analyse d'une protéine est pratiquement complète est le fait que l'azote de l'ensemble des acides aminés et des amides est pratiquement égal à l'azote total de la protéine. Mais cet argument ne signifie aucunement que les résultats de l'analyse soient justes : des compensations d'erreurs peuvent se produire, et d'autant plus que le nombre d'espèces différentes d'acides aminés est plus grand. Il nous paraît utile de donner ici une méthode de calcul qui limite, si elle ne supprime pas, la possibilité de telles compensations. Cette méthode consiste à comparer les valeurs du poids moléculaire de la protéine obtenues à partir, d'une part, de l'azote total et du nombre d'atomes d'azote de la protéine, et d'autre part des résultats analytiques concernant les acides aminés individuels. Ces valeurs, sans coïncider exactement, doivent être suffisamment proches l'une de l'autre. En fait, si on connaissait le nombre des acides en bout de chaîne, on pourrait ajouter à la somme des poids des résidus le poids d'un nombre de molécules d'eau égal à la moitié du nombre de ces acides aminés, et les valeurs du

poids moléculaire de la protéine, calculées par les deux méthodes, devraient être égales.

Pour la première détermination, soit (a) la teneur pour 100 en azote total de la protéine, et (b) le nombre d'atomes d'azote calculés à partir du nombre de résidus de tous les acides aminés et des amides ; on a évidemment :

$$PM_1 = \frac{100 \cdot 14 \cdot (b)}{(a)}$$

La précision de cette détermination est celle du dosage de l'azote total de la protéine ; le nombre de résidus est forcément précis, puisqu'il s'agit de la somme de nombres entiers par définition.

Pour la deuxième détermination, soit (c) le nombre de chaînes peptidiques à extrémités libres (correspondant à 2 (c) acides aminés en bout de chaîne) dans la protéine, on a :

$$PM_2 = \Sigma \text{ poids des résidus } + 18 (c)$$

L'accord entre PM_1 et PM_2 ne peut avoir lieu que pour des valeurs bien déterminées du rapport poids du résidu/poids d'azote, pour chacun des acides aminés considérés. Or ce rapport est susceptible d'assez grandes variations, comprises entre 2,77 pour l'arginine et 11,65 pour la tyrosine ; ces variations font que si, dans une analyse on trouve, par rapport à ce qui existe dans la protéine, plus d'un certain acide aminé et moins d'un autre, de telle sorte que l'azote total reste le même, l'accord entre PM_1 et PM_2 n'existe plus.

Dans le cas de l'unité élémentaire d'insuline de bœuf, on a les valeurs expérimentales suivantes :

Azote total de la protéine, sèche et sans cendres, d'après Chibnall (18) : 15,54 %.

Nombre d'atomes d'azote de la protéine, calculés à partir des résidus des acides aminés et des amides : 129 %.

$$PM_1 = \frac{100 \cdot 14 \cdot 129}{15,54} = 11.622$$

Somme des poids des résidus, compte tenu des 12 NH_2 remplaçant autant de OH : 11.383.

Nombre de chaînes peptidiques à extrémités libres d'après Sanger (85) ; 4.

$$PM_2 = 11.383 + 72 = 11.455$$

$$PM_1 - PM_2 = 167 \text{ soit } 1.4 \%$$

Cette différence est due probablement à l'existence dans la molécule d'insuline d'une certaine quantité d'eau, 9 molécules par unité d'insuline, que les méthodes habituelles de dessiccation sont incapables d'éliminer, et qui est vraisemblablement de l'eau « de constitution ».

Quant à la présence d'un résidu supplémentaire de proline dont il y aurait alors 3 résidus, comme le calcule Tristram au lieu de 2 comme nous le trouvons, on voit facilement qu'elle ne modifierait guère la différence en question.

Nous admettons donc que le poids moléculaire de l'unité d'insuline est de 11.620. Cette valeur est de 3,2 % inférieure à celle de 12.000 trouvée en faisant la moyenne de l'ensemble des valeurs calculées à partir des données analytiques correspondant à chacun des acides aminés. Il est évident qu'il n'y a là aucune contradiction mais, au contraire, une précision.

RÉSUMÉ

Dans la première partie de notre travail, nous avons réuni la bibliographie et les généralités concernant les méthodes d'isolement des acides aminés et des peptides et leur chromatographie.

Dans la deuxième partie, nous décrivons la mise au point d'une méthode d'analyse chromatographique, permettant de séparer quantitativement les acides aminés et les oligopeptides en les groupes suivants :

- I. Composés basiques, adsorbés sur gel de silice.
- II. Composés acides, adsorbés sur alumine acide.
- III. Composés neutres aromatiques, adsorbés sur charbon.
- IV. Composés neutres non aromatiques :

A. — Glycine, sérine, thréonine, β -alanine, cystéine, peptides, adsorbés sur alumine acide en présence de formol à 10 %.

B. — Glycyl-, séryl-, thréonyl-, cystéyl-peptides, adsorbés sur alumine acide en présence de formol à 1 %.

Nous avons étudié en détails la préparation des adsorbants et les conditions d'adsorption et d'élution dans chacun de ces groupes. Les difficultés dues à l'influence du chlorure de sodium sur l'adsorption par le gel de silice ont été évitées en neutralisant l'acide chlorhydrique subsistant dans un hydrolysat chlorhydrique par la lithine et non par la soude. Nous avons de même étudié et résolu la question de l'influence du pH dans le cas de l'adsorption sur alumine acide en présence de formol à 10 % et de formol à 1 %. Nous avons

constaté que dans ces deux derniers cas, la récupération des corps adsorbés par l'élution à l'eau chaude est en fait satisfaisante. La spécificité de toutes les séparations a été contrôlée, en plus de l'azote, par les dosages spécifiques et par chromatographie de partage sur papier.

La troisième partie a été consacrée à l'application de la méthode chromatographique décrite par nous à l'étude de la composition de l'insuline de bœuf. Les résultats obtenus sont en excellent accord avec ceux de Chibnall et de Tristram, ce qui montre la validité, au point de vue quantitatif comme au point de vue qualitatif, de la méthode de séparation en question. Les seules différences concernent l'acide glutamique et la leucine dont on trouve ici un résidu de plus et la proline dont on trouve ici un résidu de moins : nous avons de nombreuses preuves permettant de considérer nos résultats comme étant justes.

Une méthode de dosage de la proline a été indiquée, basée sur la chromatographie de partage sur papier, avec révélation par l'isatine au lieu de ninhydrine.

La formule brute de l'unité élémentaire d'insuline apparaît comme étant :

Gly₇ Ala₆ Sér₆ (Cy.S)₄₂ Thr₂ Val₈ Leu₁₃ Ileu₂

Pro₂ Phe₆ Tyr₈ Asp₃ Glu₁₆ (NH₂)₁₂ Lys₂ His₄ Arg₂

Le poids moléculaire de l'unité élémentaire d'insuline, calculé à partir du nombre d'atomes d'azote et de la proportion d'azote total de la protéine est de 11.620. Il ne diffère que de 1.4 % de celui que l'on peut calculer à partir des résidus des acides aminés constituant la molécule, compte tenu des 8 acides aminés qui forment les extrémités des 4 chaînes peptidiques. Cette légère différence, supérieure à l'erreur probable du dosage de l'azote total, est vraisemblablement due à l'existence, dans l'insuline, d'eau de constitution dont l'élimination n'est guère possible par les méthodes habituelles de séchage.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Adams B.A. et Holmes E.L. - J. Soc. Chem. Ind. 1935, **54** ; 1.
- 2 Albanese A.A. - J. biol. Chem. 1940, **134** ; 467.
- 3 Alexander B., Landwehr G. et Seligman A.M. - J. biol. Chem. 1945, **160** ; 51.
- 4 Bates R.W. - J. biol. Chem. 1937, **119**. Proc. vii.
- 5 Behrman A.S. - Ind. Eng. Chem. 1949, **41** ; 447.
- 6 Bell D.J. - J. Chem. Soc. 1944, 473.
- 7 Bendall J.R., Partridge S.M. et Westall R.G. - Nature 1947, **160**, 374.
- 8 Bergdoll M.S. et Doty D.M. - Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.) 1946, **18** ; 600.
- 9 Bergmann M. et Stein W.H. - J. biol. Chem. 1939, **128** ; 217.
- 10 Block R.J. - Proc. Soc. Exp. Biol. Méd. 1942, **51** ; 252.
- 11 Block R.K. - Science 1948, **108** ; 608.
- 12 Brand E. - Ann. N.Y. Acad. Sci. 1946, **47** ; 187.
- 13 Brimley R.C. - Nature 1949, **163** ; 215.
- 14 Brunauer S. Emmett P.H. et Teller E. - J. Amer Chem. Soc. 1938, **60**, 309.
- 15 Bull H.B. Hahn J.W. et Baptist V.H. - J. Amer Chem. Soc. 1949, **71**, 550.
- 16 Calvery H.O. - The Chemistry of the Amino Acids and Proteins - Springfield, Ill, 1945, p. 123.
- 17 Gannan R.K. - J. biol. Chem. 1944, **152**, 401.
- 18 Chibnall A.C., Rees M.V. et Williams E.F. - Biochem. J. 1943, **37**, 354.
- 19 Chibnall A.C. - J. Intern. Soc. Leather Trades Chem. 1946, **30**, 1.
- 20 Claesson S. - The Swedberg 1884-1944. Upsala 1944, p. 82.
- 21 Claesson S. - Arkiv Kemi Mineral A.J.P. - Biochem. J. 1944, **38**,
- 22 Consden R. Gordon A.H. et Martin A.J.P. - Biochem. J. 1944, **38**, 224.
- 23 Consden R. Gordon A.H. et Martin A.J.P. - Biochem. J. 1947, **41**, 590.

- 24 Gossden R. Gordon A.H. Martin A.J.P. et Synge R.L.M. - Biochem. J. 1947, **41**, 596.
- 25 Craig L.C. - J. biol. Chem. 1944, **155**, 519.
- 26 Craig L.C. Columbia C. Mighton H. et Titus E.J. - J. biol. Chem. 1945, **161**, 321.
- 27 Dakin H.D. - Biochem. J. 1918, **12**, 290.
- 28 Jackson S.E. Sutherland G.B.M. et Tristram G.R. - Biochem. J. 1948, **42**, 508.
- 29 Dent C.E. - Biochem. J. 1947, **41**, 240.
- 30 Dent C.E. Stepka W. et Steward F.C. - Nature 1947, **160**, 682.
- 31 Dent C.E. - Biochem. J. 1948, **43**, 169.
- 32 Drake B. - Nature 1947, **160**, 602.
- 33 Dunn M.S. et Loshakoff A. - J. biol. Chem. 1936, **113**, 691.
- 34 Elsdon S.R. et Synge R.L.M. - Biochem. J. 1944, **38**, Proc. ix.
- 35 Elsdon S.R. - Biochem. J. 1946, **40**, 252.
- 36 Fischer E. - Z. physiol. Chem. 1901, **33**, 151.
- 37 Fischer R.B. Parsons D.S. et Morrisson G.A. - Nature 1948, **161**, 764.
- 38 Flood A.E. Hirst E.L. et Jones J.K.M. - Nature 1947, **160**, 86.
- 39 Folin O. et Marenzi A. - J. biol. Chem. 1929, **83**, 89.
- 40 Folin O. et Marenzi A. - J. biol. Chem. 1929, **83**, 103.
- 41 Forsyth W.G.C. - Nature 1948, **161**, 239.
- 42 Foster G.L. et Schmidt C.L.A. - J. biol. Chem. 1923, **56**, 545.
- 43 French D. et Edsall J.T. - Adv. in Protein Chem. 1945, **2**, 277.
- 44 Frodenberg K. Walch H. et Molter - Naturwiss. 1942, **30**, 87.
- 45 Fromaget O. et Colas R. - Biochim. Biophys. Acta 1949, **3**, 417.
- 46 Flürth O. et Dische Z. - Biochem. Z. 1924, **146**, 275.
- 47 Olson L.E. - J. biol. Chem. 1941, **140**, Proc. xlv.
- 48 Goldberg H.I. Chida I.E. et Tishkoff G.H. - J. Dental Research 1948, **27**, 493.
- 49 Gordon A.H. Martin A.J.P. et Synge R.L.M. - Biochem. J. 1943, **37**, 190.
- 50 Gordon A.H. Martin A.J.P. et Synge R.L.M. - Biochem. J. 1943, **37**, 190.
- 51 Gordon A.H. Martin A.J.P. et Synge R.L.M. - Biochem. J. 1943, **37**, 313.
- 52 Gordon A.H. Martin A.J.P. et Synge R.L.M. - Biochem. J. 1944, **38**, 109.
- 53 Grasmann W. et von Arnim K. - Ann. der Chemie 1935, **519**, 192.
- 54 Hamoir G.C.M. - Biochem. J. 1945, **39**, 485.
- 55 Harris R. et Wick A.N. - Ind. Eng. Chem. anal. Ed. 1946, **18**, 276.
- 56 Hawthorne J.R. - Nature, 1947, **160**, 714.
- 57 Isherwood F.A. - Biochem. J. 1946, **40**, 668.
- 58 Lüssi M. et Tschener S. - Bull. Soc. Chim France 1947, 389.
- 59 Kapeller-Adler R. - Biochem. Z. 1932, **252**, 185.
- 60 Kuhn R. et Desnuelle P. - Ber. 1937, **70**, 1907.
- 61 Kuhn R. et Wieland T. - Ber. 1940, **73**, 962.
- 62 Lecerier E. et Tchen Pau Kium - Biochim. Biophys. Acta 1947, **1**, 35.
- 63 Lecerier E. - Progrès récents de la Chromatographie, Hermann et Cie, Paris 1949.
- 64 Lens J. - Biochim. Biophys. Acta - 1948, **2**, 76.
- 65 Jones W.H. et Norell E.T. - Nature 1947, **160**, 87.

- 66 MacFadyen D.A. - J. biol. Chem. 1945, 158, 171
- 67 MacPherson H.T. - Biochem. J. 1946, 40, 615
- 68 Mantell C.L. Adsorption. McGraw, New York et London 1945
- 69 Martin A.J.P. et Synge R.L.M. - Biochem. J. 1944, 38, 1
- 70 Martin A.J.P. et Synge R.L.M. - Biochem. J. 1944, 38, 172
- 71 Martin A.J.P. et Synge R.L.M. - Adv. Enzymol. Series 1945, 2
- 72 Martin A.J.P. Ann. N.Y. Acad. Sc. 1946, 49, 245
- 73 Martin A.J.P. et Mittelmann R. - Biochem. J. 1946, 40, 555
- 74 Michaelis L. et Rona P. - Biochem. Z. 1925, 192, 266
- 75 Moore S. et Stein W.H. - Ann. N.Y. Acad. Sc. 1946, 49, 215
- 76 Naftalin L. - Nature 1948, 161, 103
- 77 Partridge S.M. - Nature 1946, 158, 270
- 78 Partridge S.M. - Nature 1949, 163, 235
- 79 Partridge S.M. et Westall R.C. - Biochem. J. 1945, 44, 62
- 80 Pauli W. - Biochem. Z. 1924, 152, 355
- 81 Polson A. Mosley V.M. et Westall R.C. - Biochem. J. 1945, 39, 603
- 82 Ramsey L.L. et Patterson W.I. - J. Exp. Biol. 1945, 28, 644
- 83 Ramsey L.L. et Patterson W.I. - J. Exp. Biol. 1945, 29, 337
- 84 Rittenberg D. et Foster G.L. - J. biol. Chem. 1946, 166, 757
- 85 Sanger F. - Biochem. J. 1945, 39, 507
- 86 Sanger F. - Biochem. J. 1946, 40, 261
- 87 Schramm G. et Primosigh J. - Ber. 1943, 76, 373
- 88 Schramm G. et Primosigh J. - Ber. 1944, 77, 417
- 89 Schramm G. et Primosigh J. - Ber. 1944, 77, 476
- 90 Schwab G.M. et Dettler G. - Adv. Enzymol. Series 1945, 2, 50
- 91 Schwab G.M. et Jochen K. - Adv. Enzymol. Series 1945, 2, 56
- 92 Schweigert B.S. Melnyre J.M. Evergreen S.A. et Swartz H.D. - J. biol. Chem. 1944, 115, 183
- 93 Siewert G. et Jungnickel H. - Ber. 1943, 76, 171
- 94 Smith E.L. - Biochem. J. 1942, 36, 100
- 95 Snell E.E. - Adv. in Protein Chem. 1945, 2, 35
- 96 Sperber E.-J. Biol. Chem. 1946, 166, 75
- 97 Stein W.H. et Moore S. - J. biol. Chem. 1943, 154, 327
- 98 Strain H.H. - Chromatography. Academic Press 1942, 88
- 99 Synge R.L.M. - Biochem. J. 1944, 38, 285
- 100 Tarte P. - Bull. Soc. Roy. Sc. Suède 1945, 4, 25
- 101 Tiselius A. - Ark. Kemi. Miner. Geol. 1941, 148, 32
- 102 Tiselius A. - Ark. Kemi. Miner. Geol. 1941, 150, 5
- 103 Tiselius A. - Ark. Kemi. Miner. Geol. 1941, 151, 5
- 104 Tiselius A. et Claesson S. - Ark. Kemi. Miner. Geol. 1941, 151, 18
- 105 Tiselius A. - Ark. Kemi. Miner. Geol. 1943, 164, 5
- 106 Tiselius A. et Hane L. - Ark. Kemi. Miner. Geol. 1943, 164, 100
- 107 Tiselius A. - The Svedberg 1944, 2, 100
- 108 Tiselius A. - Adv. in Protein Chem. 1945, 2, 35
- 109 Tiselius A. Drake E. et Hagberg - Experiments 1945, 2, 100

- 110 Tishkoff G.H., Zaffaroni A. et Tesluk H. - J. biol. Chem. 1948, **175**, 857.
- 111 Treadwell W.D. et Bergsland J. - Helv. Chim. Acta 1945, **28**, 945.
- 112 Tristram G.R. - Biochem. J. 1946, **40**, 721.
- 113 Turba F. - Ber. 1941, **74**, 1829.
- 114 Turba F. et Richter M. - Ber. 1942, **75**, 340.
- 115 Turba F., Richter M. et Kuchar F. - Naturwiss. 1943, **31**, 508
- 116 Van Slyke D.D., Dillon R.T., Mc Fadyen D.A. et Hamilton P.-J. biol. Chem. 1941, **141**, 627.
- 117 Van Slyke D.D., Hiller A., McFadyen D.A. - J. biol. Chem. 1941, **141**, 681.
- 118 Van Slyke D.D. Hiller A. et Dillon R.T. - J. biol. Chem. 1942, **146**, 137.
- 119 Vervey E.J. - Chem. Weeksbblatt 1934, **52**, 789.
- 120 Wachtel J.-L. et Cassidy H.G.-J. Amer. Chem. Soc. 1943, **65**, 665.
- 121 West E., Christensen B. et Rinehart R. - J. biol. Chem. 1940, **132**, 681.
- 122 Wieland T. - Z. physiol. Chem. 1942, **273**, 24.
- 123 Wieland T. - Naturwiss. 1942, **30**, 373.
- 124 Wieland T. - Ber. 1942, **75**, 1001.
- 125 Wieland T. - Die Chemie 1943, **56**, 213.
- 126 Wieland T. et Wirth L. - Ber. 1943, **76**, 823.
- 127 Wieland T. et Fremery H. - Ber. 1944, **77**, 234.
- 128 Wieland T. - Ber. 1944, **77**, 539.
- 129 Wieland T. et Fischer E. - Naturwiss. 1948, **35**, 29.
- 130 Winnick T. - J. biol. Chem. 1942, **142**, 461.
- 131 Winsten W.R. et Spark A.H. - Science 1947, **106**, 192.
- 132 Winters J.C. et Kunin R. - Ing. Eng. Chem. 1949, **41**, 460.
- 133 Woïwod - Biochem. J. 1948, **42**, Proc. xxviii.

OCTOBRE 1949

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	3
PREMIERE PARTIE	5
I. Ensemble des méthodes permettant l'isolement des acides aminés et des peptides	5
II. Bibliographie et généralités concernant la chromatographie d'acides aminés et de pep- ptides	6
1 - Chromatographie par adsorption vraie	6
2 - Chromatographie par échange d'ions	9
3 - Chromatographie de partage	14
DEUXIEME PARTIE	17
I. Adsorption des dérivés basiques sur gel de silice	19
II. Adsorption des dérivés acides sur alumine acide	27
III. Adsorption des dérivés aromatiques par le charbon	30
IV. Séparations chromatographiques d'acides ami- nés et de peptides neutres en présence de for- mol	34
1 - Adsorption de peptides neutres sur alu- mine acide en présence de formol à 10 %	37

2 - Adsorption de glycyl-, seryl- et cystéyl-peptides sur alumine acide en présence de formol à 1 %	40
TROISIÈME PARTIE.....	47
Application à l'insuline - Avec une note sur le dosage de la proline	47
I. Partie expérimentale	48
1 - Préparation de l'hydrolysat	48
2 - Fractionnement de l'hydrolysat par chromatographie en 4 groupes d'acides aminés	48
3 - Méthode analytique quantitative sur papier	50
II, Dosage de la proline	50
III. Résultats	52
APPENDICE	57
RESUME	61
BIBLIOGRAPHIE	63
TABLE DES MATIERES	67

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Méthodes d'étude de la fonction aminée libre dans les protéines

Vu et approuvé :

Paris, le 3 Novembre 1949

Le Doyen de la Faculté des Sciences

A. CHATELET

VU

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie
de Paris

Jean SARRAILH

E R R A T U M

- p. 11, ligne 26 : Au lieu de « tampon N acide acétique », lire « tampon N acide acétique-acétate (pH 3,3) ».
- p. 18, ligne 9 : Au lieu de « l'adsorption de l'ionophorèse », lire « l'adsorption et l'ionophorèse ».
- p. 34, 1^{re} ligne : Au lieu de « Séparations chromatiques », lire « Séparations chromatographiques ».
- p. 34, dernière ligne : Au lieu de « les leuciles », lire « les leucines ».
- p. 63, référence 21 : Au lieu de « Arkiv Kemi Mineral A.J.P. », lire « Arkiv Kemi Mineral Geol ».

